



EESTI MAAÜLIKOOL  
Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

**Kai Kaidma**

## **VÕI MIKROBIOLOOGILISE KVALITEEDI HINDAMINE**

### **EVALUATION OF MICROBIOLOGICAL QUALITY OF BUTTER**

Magistritöö  
Liha- ja piimatehnoloogia õppekava

Juhendaja: dotsent Helena Andreson, *PhD*

Tartu 2017

Eesti Maaülikool		Magistritöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Kai Kaidma		Õppekava: Liha- ja Piimatehnoloogia	
Pealkiri: Või mikrobioloogilise kvaliteedi hindamine			
Lehekülgi: 71	Jooniseid: 10	Tabeleid: 17	Lisasid: 2
Osakond: Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia osakond			
Uurimisvaldkond: Toiduainete ja jookide tehnoloogia T430			
Juhendaja: Dotsent Helena Andreson, <i>PhD</i>			
Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2017			
<p>Või mikrobioloogiline kvaliteet sõltub mitmetest teguritest – tooraine kvaliteedist, töötlemisviisidest, kasutatud lisanditest, aga ka pakendamisest. Lisandite lisamisega parandatakse toote maitsekvaliteeti, kuid nende lisamisel võib tootesse sattuda soovimatuid mikroorganisme. Vaatamata või kõrgele rasvasisaldusele ning kvaliteetsele tootmisele ja sellest tulenevalt pikale säilivusajale, võib ristsaastumise tulemusel toote kvaliteet aga märgatavalt langeda ning säilivusaeg lüheneda.</p> <p>Antud magistritöö eesmärk oli hinnata mikroobide, sh. hallitus- ja pärmseente, esinemist erinevat tüüpi võides. Selgitada, kuidas mõjutab või plasmafaasi eraldamine võirasvast mikroobide üldarvu hindamist ning tuvastada, kuidas mõjutavad maitselisandid (soolakristallid, karulauk ja päikesekuivatatud tomat) mikroobide üldarvu võis.</p> <p>Uurimustööks vajalik materjal, proovid traditsioonilisest ja lisanditega võist, koguti koostöös kahe erineva Eestis tegutseva piimatööstusettevõttega perioodil september 2016 kuni märts 2017. Kokku koguti võiproove 37. võipartiist ja viiest maitselisandi partiist.</p> <p>Töös kasutati mikroobide üldarvu hindamisel nelja erinevat meetodit või plasmafaasi eraldamiseks rasvafaasist. Kasutatud meetodite puhul leiti mikroobide üldarvus mitmeid erinevusi, mis tulenevad või plasma- ja rasvafaasi segunemisest proovivõtul. Mida enam sisaldas võiproov rasvafaasi, seda väiksem oli mikroobide üldarv. Mikroobide üldarv sama tööstuse traditsioonilises ja soolakristallidega võis oli sarnane (<math>p&gt;0,05</math>), jäädes vahemikku 2,05 – 2,65 log PMÜ/ml, samas kui päikesekuivatatud tomati- ja karulaugulisandiga võis oli see eelmistega võrreldes oluliselt kõrgem (2,89 - 3,55 log PMÜ/ml, <math>p&lt;0,05</math>).</p>			

Hallitus- ja pärmseente kasvu tuvastati vaid 6 võipartiis. Kõige enam leidis hallitus- ja pärmseeni taimsete maitselisanditega ehk päikesekuivatatud tomati- ja karulaugulisandiga võis.

Magistritöö raames identifitseeriti MALDI-TOF analüüsil võiproovidest isoleeritud mikroobe. Kõige suurem liigiline varieeruvus (14 liiki) leiti päikesekuivatatud tomatiga võis, kus enim esindajaid kuulusid perekondadesse *Bacillus*, *Lactobacillus* ja *Staphylococcus*.

Kokkuvõtteks võib öelda, et või mikrobioloogiline kvaliteet Eestis on väga hea, kuid tugevamate seoste leidmiseks mikrobioloogilise kvaliteedi hindamismeetodite ja erinevate võitüüpi vahel peaks uuritavat valimit oluliselt suurendama.

Märksõnad: või, metoodika, mikroobide üldarv, või maitselisandid

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Kai Kaidma		Speciality: Meat and Dairy Technology	
Title: Evaluation of Microbiological Quality of Butter			
Pages: 71	Figures: 10	Tables: 17	Appendixes: 2
Department: Department of Food Science and Technology Field of research: Food and drink technology T430 Supervisors: Associate professor Helena Andreson, <i>PhD</i> MSc Place and date: Tartu 2017			
<p>Microbiological quality of butter depends on many factors such as quality of raw material, processing methods, used additives but also packaging process. Flavor additives are used to improve the product quality, but they might also contaminate the product with microbes. Despite the high level of fat and quality of production and long storage time coming from that, the result of crosscontamination may degrade the quality of the product and decrease its storage time.</p> <p>Aim of this study was to evaluate the presence of microbes in various types of butter. To explain how reducing fat in serumphase in butter samples may influence the evaluation of the total number of microbes and to identify how saltcrystals and herbs (ramsons and sundried tomato) influence the total number of microbes in butter.</p> <p>Materials, samples from traditional butter and butter with salt or herb additives, were collected in co-operation with two Estonian dairy companies during September 2016 to March 2017. In total there were collected samples from 37 batches of butter and five batches of additives used in tested butter.</p> <p>Four distinct methods to separate serum phase from the fat phase were used in this work. A strong negative correlation between the total count of microbes and fat content in samples was found. The higher was the fat content in sample, the lower was the count of microbes. The amount of microbes in traditional and salt crystals containing butter is similar (<math>p&gt;0.05</math>), ranging from 2.05 – 2.65 log CFU/ml, while in butter with sundried tomato or ramsons the level is significantly higher compared to previous (2.89 – 3.55 log CFU/ml, <math>p&lt;0.05</math>).</p> <p>Molds and yeasts were present in only six butter batches. Most of the molds and yeasts were found in buttersamples containing herbs.</p>			

In the context of the research MALDI-TOF analysis was conducted to identify microbes isolated from the buttersamples. The biggest variation in species (14 species) was found in buttersamples containing sundried tomatoes – mostly species from genus *Bacillus*, *Lactobacillus* and *Staphylococcus*.

In conclusion, it is possible to say that the microbial quality of the butter produced in Estonia is very good. To assess a stronger connection between the evaluation methods of microbiological quality and different types of butter, the tested sample size must be significantly higher, covering different seasons due to fluctuations in raw milk, influencing microbiota in the butter.

Keywords: butter, methods, total count number of microbes, butter flavoring

# SISUKORD

LÜHENDID .....	8
SISSEJUHATUS .....	9
TÄNUAVALDUS .....	10
1. KIRJANDUSE ANALÜÜS .....	11
1.1. Või valmistamine läbi ajaloo .....	11
1.2. Või koostis ja omadused .....	11
1.3. Või liigid .....	12
1.4. Mikrobioloogiline kooslus .....	13
1.4.1. Mikrobioota kooses .....	15
1.4.2. Mikrobioota võis .....	16
1.5. Tehnoloogiliste etappide mõju mikroobide arengule võis .....	18
1.6. Lipolüüs ja selles osalevad mikroorganismid .....	21
1.7. Tootmishügieen .....	21
1.8. Erinevate maitseisandite mõju või mikrobioloogilisele kvaliteedile .....	22
1.8.1. Sool .....	22
1.8.2. Maitsetaimed .....	23
1.9. Mikroobide osalusel tekkivad vead võis .....	24
1.10. Mikrobioloogilised nõuded või tootmisel .....	25
1.10.1. Mikroobide üldarvu määramine .....	27
1.10.2. Hallitus- ja pärmseente määramine .....	28
1.10.3. Kolilaadsete bakterite määramise meetod .....	28
1.10.4. Mikroobide identifitseerimine: MALDI-TOF .....	29
KIRJANDUSE ANALÜÜSI KOKKUVÕTE .....	31
2. MATERJAL JA METOODIKA .....	33
2.1. Töö eesmärgid .....	33
2.2. Proovimaterjal, ettevalmistus ja meetodid .....	33
2.2.1. Uuritav materjal .....	33
2.2.2. Proovide ettevalmistus ja meetodid .....	34
2.2.3. Mikrobioloogiline analüüs .....	36
2.2.3.1. Mikroobide üldarvu määramine .....	37
2.2.3.2. Mikroobide väjakasvu hindamine või rasvafaasist .....	37

2.2.3.3. Kolilaadsete bakterite väljakasvu hindamine .....	38
2.2.3.4. Mikroobide kasvatamine erisöötmetel .....	38
2.2.3.5. Mikroobide identifitseerimine MALDI-TOF .....	38
2.2.3.6. Küsitlus Eesti võitootjatele .....	39
2.3. Andmete statistiline analüüs .....	39
3. TULEMUSED JA ARUTELU .....	40
3.1. Mikroobide üldarv võiproovides .....	40
3.2. Mikroobide üldarv olenevalt võitüübist ja proovivõtmismeetodist.....	43
3.2.1. Lisandite mikrobioloogiline kvaliteet.....	45
3.3. Mikroobide üldarv traditsiooniliste võide võrdluses .....	46
3.4. Toorainepõhine võitüüpide võrdlus.....	47
3.5. Hallitus- ja pärmseente üldarv võiproovides .....	48
3.6. Mikroorganismide isoleerimine ja samastamine .....	50
3.7. Eesti võitootjatele tehtud küsitluse tulemused.....	54
KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED .....	55
KASUTATUD KIRJANDUS .....	57
SUMMARY .....	63
LISAD .....	65
Lisa 1. Töövahendid ja söötmed.....	66
Lisa 2. Küsimustik „Või mikrobioloogiline hindamine“ .....	67

## LÜHENDID

KL – karulaugulisandiga võiproov piimatööstusest „1“

M17 – streptokokkide kasvatamiseks kasutatav kasvumeedium e. sööde

MALDI-TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – time of flight*, maatriksainega vahendatud ioniseerival kiirgusel (laseril) põhinev desorptsioon-ioniseerimine (maatriks-mahitatud laserdesorptsioon-ionisatsioon) - “lennuaja-detektor”

MRS – laktobatsillide kasvatamiseks kasutatav kasvumeedium e. sööde

PMÜ/g – pesasid moodustavad ühikud grammi kohta

PMÜ/ml – pesasid moodustavad ühikud milliliitri kohta

PT – päikesekuivatatud tomatilisandiga võiproov piimatööstusest „1“

R+gl – Võirasva ja glütserooli emulsioon mikroobide määramiseks

SK – soolakristallidega võiproov piimatööstusest „1“

T1 – piimatööstus „1“

T2 – piimatööstus „2“

TR1 – traditsioonilise või proov piimatööstusest „1“

TR2 – traditsioonilise või proov piimatööstusest „2“

TSA – universaalsööde mikroobide kasvatamiseks



## SISSEJUHATUS

Või on loomse päritoluga toiduaine, mida on kasutatud ammustest aegadest kulinaarsetel ja meditsiinilistel eesmärkidel. Tänapäeval kogub aga üha enam või tootmisel populaarsust erinevate maitselisanditega võitoodete valmistamine ja tarbimine. Lisandite lisamisega parandatakse toote maitse kvaliteeti, kuid nende lisamisel võidakse tahtmatult tootesse viia soovimatuid mikroorganisme. Kuigi tänu kõrgele rasvasisaldusele ning kvaliteetsele tootmisele on võiil pikk säilivusaeg siis ristsaastumise tulemusel võib toote kvaliteet langeda ning säilivusaeg lüheneda.

Enamik kaasaegseid kirjandusallikaid viitavad asjaolule, et või mikrobioloogilised uurimismeetodid on välja töötatud eelmise sajandi alguses, seetõttu oleks asjakohane üle vaadata või mikrobioloogiliste uuringute standardmeetodite sobivus mikroobide üldarvu, sh. hallitus- ja pärmseente adekvaatseks määramiseks nii traditsioonilises kui ka lisanditega võis. Antud töö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse mikrobioloogilistest aspektidest lähtudes või koostist ja omadusi. Tuuakse välja lubatud mikroorganismide piirnormid nii või valmistamise tooraine ehk koore, kui ka või kohta. Käsitletakse või valmistamise olulisemaid tehnoloogilisi etappe, kus võib tekkida oht või mikrobioloogiliseks saastumiseks. Samuti kirjeldatakse lisandite kasutamisel tekkivaid ohte.

Materjal ja meetodika osas kasutatakse nelja mikrobioloogilist meetodit mikroobide ning hallitus- ja pärmseente üldarvu määramiseks võis. Meetodid, erinevad üksteisest peamiselt testitavate võiproovide plasma- ja rasvafaaside erineva tasemelise segunemise osas.

## TÄNUAVALDUS

Täna käesoleva magistritöö katsematerjali kogumisel ja küsimustikus osalemisega suureks abiks olnud Eestis tegutsevad piimandusettevõtteid – AS Saaremaa Piimatööstus, E-PIIM AS, Estover Piimatööstus OÜ ja TERE AS.

Mikrobioloogiliste analüüside teostamisel on asendamatuks abiks olnud EMÜ toiduteaduse- ja tehnoloogiaosakonna mikrobioloog-laborant Kersti Veske, kes valmistas ette steriilsed söötmed jm. katsete läbiviimiseks vajaliku steriilse inventari. MALDI-TOF analüüside teostamisel oli suureks abiks Tartu Ülikooli Biomeedikumi mikrobioloogia osakonna mikrobioloog-biokeemik Tiiu Rööp. Suured tänud ka Tartu Ülikooli Kliinikumi kliinilise mikrobioloogia osakonna töötajatele.

Samuti tänan Eesti Maaülikooli veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia osakonda ning selle abivalmis ja töökas kollektiivi.

Lõpetuseks tahan tänada oma magistritöö valmimisele kaasaaitajat ja juhendajat dotsent Helena Andreson'i, kes on olnud töö valmimisel suureks abiks ja toeks.

Kõigele lisaks tahan ma tänada oma kannatlikku perekonda, kes on olnud kõik need kaks aastat minu kõrval ja toetanud mind.

# 1. KIRJANDUSE ANALÜÜS

## 1.1. Või valmistamine läbi ajaloo

Võid on valmistatud juba aastatuhandeid. Sellest on lugupeetud kui väärtuslikust toiduainest, kuid samas on seda kasutatud ka meditsiinilisel otstarbel. (Parker 1948)

Tööstuslikule või tootmisele pani aluse *Gustaf de Laval* (1845 – 1913), kes töötas välja piimatööstustele ühe olulisema leiutise ehk koorelahutaja 1877. aastal (Bylund 1995: 91)

Enne separaatori leiutamist valmistati võid toorpiimast koore setitamise põhimõttel, mis tähendas, et koore eraldamisel lasti toorpiimal üleöö kaussides seista. Või mikrobioloogilist kvaliteeti määrasid antud ajal toorpiima ja koore loomulik mikrobioota, mis andis võile iseloomuliku maitse. (Budkhar *et al.* 2014: 731) Seismisel koor hapustus loomulikul teel olemasolevate mikroobide osalusel ning tulemuseks saadi hapukoorevõi. Lõpptoote kvaliteet oli ebastabiilne, kuna tihtipeale sattus koorde võõrmikrobiootat ka väliskeskkonnast. (Goff 2017) Arvati, et või valmistamisel võitera pesemine kuumutamata veega tõstab toote kvaliteeti, kuid tegelikkuses lisati antud tegevusega võisse vees olevaid mikroorganisme. Võõrmikrofloora allasurumiseks kasutati või soolamist. (Budhkar *et al.* 2014: 733)

Mikrobioloogilisest aspektist on piima ja piimatoodete kvaliteedi määramisel suur tähtsus toorpiima ning toorkoore pastöriseerimisel. Prantsuse mikrobioloog *Louis Pasteur* (1822 - 1895) pani aluse pastöriseerimise protsessile, millega paranes suurel määral paljude toiduainete ja jookide mikrobioloogiline kvaliteet. Aastal 1865 avastas ta, et veini säilivust saab pikendada, kui inaktiveerida bakterid kuumtöötlemisel temperatuuril, mis oleks keemistemperatuurist madalam. Pastöriseerimine jõudis laialdasema, tööstusliku kasutamiseni XIX sajandi esimesel poolel. (Fuquay *et al.* 2011: 193)

## 1.2. Või koostis ja omadused

Rahvusvahelise definitsiooni järgi on või emulsioon, kus vesi on disperseerunud rasvas. Või rasvasisaldus ei tohi olla madalam kui 80% ning veesisaldus võib olla maksimaalselt 16%.

Vastavalt Euroopa Liidu turukorraldusmäärusele on piimarasvatooted jagatud rasvasisalduse järgi gruppidesse (tabel 1). (EL määrus 1308/2013)

**Tabel 1.** Piimarasva toodete liigitamine vastavalt rasvasisaldusele (EL määrus nr. 1308/2013)

Nimetus	Rasva massiprotsent %	Lisakirjeldus
Või	> 80 ... < 90	Niiskussisaldus maksimaalselt 16% ja rasvata piima kuivainesisaldus 2%
Kolmveerandrasvane või	> 62 ... < 60	-
Poolrasvane või	> 41 ... < 39	-
Piimarasvavõie X%	Alla 39	-
	> 41 ... < 60	
	> 62 ... < 80	

Vee osakaal ja selle jaotus või struktuuris on või kvaliteedi seisukohast olulise tähtsusega. Või plasma sisaldab umbes 1,7% rasvatakuivainet, milleks on laktoos, mineraalained, piimavalgud ja vees lahustuvad vitamiinid. (Poikalainen 2007)

Või koosneb piimarasvast ja on otseselt seotud piima rasvhappelise koostisega (Blaško *et al.* 2010). Või rasvhappeline koostis on väga rikkalik sellest on leitud üle 400 rasvhappe, millest kõige rohkem esineb küllastunud rasvhappeid. Küllastunud rasvhappeid on võis umbes 66% ning küllastumata rasvhapped 34% (neist 30% monoküllastumata ja 4% polüküllastumata). (Krause 2006)

Piima rasvhappeline koostis sõltub suuresti aastaajast ning sööda rotatsioonist. Suvine piimarasv sisaldab suurel määral küllastumata rasvhappeid nagu linool-,  $\alpha$ -linoleen-, vakeen-, oleiinhape ja konjugeeritud-linoolhape (CLA - *conjugated linoleic acid*) (Blaško *et al.*, 2010). Küllastumata rasvhappete koostis alandab või sulamistemperatuuri ning sellega seoses muutub või pehmemaks ja määritavamaks (Shi 2014). Talvel on aga piimarasvas rohkem küllastunud rasvhappeid nagu müristiinhapet ja steariinhapet (Blaško *et al.*, 2010), mis muudavad või tahkemaks, tõstavad hangumis- ja sulamistemperatuuri ning muudavad maitse tuimemaks (Shi 2014).

### 1.3. Või liigid

Rahvusvaheliselt üldtuntud või liigid on rõõsakoorevõi, hapukoorevõi ja soolatud või (Ruth *et al.* 2007). Tuginedes Statista 2015 aasta andmetele toodeti maailmas umbes 10

miljonit tonni võid aastas. Kõige enam ehk üle poole või toodangust toodab India. Euroopa Liidus toodetakse aga 20% võist. (Statista 2017; FAO 2017) Eestis liigub või tootmine tõusvas joones. Peamiselt toodetakse võid lehmapiimast. 2016. aastal toodeti Eestis 5,9 tuhat tonni võid. Statistika andmetel on või tootmine suurenenud 3,2% võrreldes 2015 aastaga. (Maaeluministeerium 2017) Euroopas toodetakse ja tarbitakse põhiliselt rõõsast koorest valmistatud võid ning juuretise sissepressimisel valmistatud hapukoorevõid. Võile hapukoore maitse andmiseks kasutatakse enamasti juuretiskultuure, mis koosnevad piimhappebakteritest. Piimhappebakterite elutegevuse käigus tekib võile iseloomulikud maitse ja lõhna komponendid diatsetüül ning atsetoiin. (Fernandes 2009)

Soolatud või on populaarsem soojema kliimaga maades nagu Austraalia, USA jt. (Fernandes 2009) Vastavalt soolasisaldusele saab võid jagada kolme rühma: kergelt soolatud (soolasisaldus 0,8%), keskmiselt soolatud (1,0 - 1,2%) ja tugevalt soolatud (2,0%) võiks (Poikalainen 2004). Maailmas on enim levinud 1,2 - 1,5% soolasisaldusega võide tootmine (Fernandes 2009).

Tootearenduse edenedes on hakatud tootma ka paljude erinevate lisanditega võisid. Põhilised lisandid, mida kasutatakse on hakitud maitsetaimed, küüslauk, mesi jms (Kornjacki *et al.* 2011). Populaarsust kogub ka igasuguste vürtside kasutamine. (Sagdic *et al.* 2010). Eestis on hakatud maitselisanditega võisid tootma AS Saaremaa piimatööstuse poolt, kus toodetakse peale traditsioonilise või (rasvasisaldus 82%) veel soolakristallidega, päikesekuivatatud tomatiga, kodusia ürtidega ja karulauguga võid (Saarejuust 2017).

## 1.4. Mikrobioloogiline kooslus

Mikrobioloogiline kooslus sõltub piimatoodetes toormaterjali ehk toorpiima mikrobiootast. Toorpiima mikrobioloogiline kooslus on väga mitmekesine. Saasteallikateks võivad olla nisakanali ja udara mikrobioota, looma tervislik seisund, sööt ja selle kvaliteet, lüpsimasina puhtus, töötajate hügieen jne. (Roasto *et al.* 2011; Elias; P., Elias, A. 2004) Toorpiimale on esitatud Eesti Vabariigi valitsuse poolt kriteeriumid (tabel 2).

**Tabel 2.** Toorpiimale esitatud kvaliteedi kriteeriumid (MÄÄRUS (EÜ) nr 853/2004)

Uuritav näitaja (ml kohta)	Pesa moodustavat ühikut (PMÜ)
Bakterite arv temperatuuril 30 °C	≤ 100 000
Somaatiliste rakkude arv	≤ 400 000

Piimatehnoloogias jagatakse piimatoodete mikrobiota lähtudes mikroobide omadustest või nende kasutamise vajadustest järgnevalt:

- patogeenne mikrobiota – enamasti sekundaarsel saastatusel tekkinud mikrobiota (Walstra *et al.* 2006; 191);
- tootmise hügieenilist taset iseloomustav mikrobiota (Bylund 1995: 50);
- tehnoloogiline mikrobiota – enamasti kasutusel tehnoloogilistel eesmärkidel starterkultuurid või juuretised (Elias, P., Elias, A. 2004).

Piimas esinevad haigust tekitavad mikroorganismid on *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (tabel 3) (Walstra *et al.* 2006; 191).

**Tabel 3.** Piimas ja piimatoodetes esinevad mikroorganismid ja nende iseloomustus (Toiduseadus § 12 lg 3)

Rühm	Mikroobi rühma iseloomustus	Näited
1.	Toidu kvaliteeti ja mikrobioloogilist stabiilsust iseloomustavad mikroorganismid	Psührofiilsed bakterid Piimhappebakterid Pärmseened Hallitusseened, v.a mükotoksiine produtseerivad liigid <i>Leuconostoc</i> spp. Mesofiilsed aeroobid Termotolerantsed mikroorganismid Proteolüütilised mikroorganismid Lipolüütilised mikroorganismid
2.	Sanitaarnäitlikud mikroorganismid ehk indikaatorbakterid	<i>Coli</i> -laadsed bakterid Termotolerantsed <i>coli</i> -laadsed bakterid <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Enterobacteriaceae</i> Sulfitit redutseerivad klostriidid
3.	Tinglikult patogeensed mikroorganismid	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Sarcocystis</i> <i>Isospora</i> <i>Cyclospora</i>

Tabeli 3 järg

4.	Otsese terviseohtlikkusega mikroorganismid, sh patogeensed mikroorganismid ning parasitaarsete haiguste tekitaja	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i> <i>Brucella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> patogeensed <i>E. coli</i> patogeensed serotüübid O:8 <i>Bacillus anthracis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Toxoplasma gondii</i>
----	--	---

Tootmise hügieenilist taset iseloomustav mikrobioota saab jagada vastavalt keskkonna tingimustele järgmiselt:

- termofiilsed mikroorganismid – kasvavad ja paljunevad eelistatult kõrgematel temperatuuridel (optimaalne temperatuur 45-60 °C);
  - mesofiilsed mikroorganismid – arenemisvõimelised ka toatemperatuuridel (optimaalne temperatuur 20-44 °C);
  - psührofiilsed mikroorganismid – elu- ja arenemisvõimelised madalatel temperatuuridel (arenevad temperatuuri vahemikus 5-15 °C);
  - psührotroopsed mikroorganismid – siia gruppi kuulub nii mesofiilseid kui ka psührofiilseid mikroorganisme, arenevad 7° C ja madalamal temperatuuril.
- (Bylund 1995: 50)

Mikrobioloogiline kontroll saavutatakse pärast toorpiima ja toorkoore pastöriseerimist, millega surutakse alla paljude sanitaar-hügieeniliste indikaatorliikide ja patogeensete mikroorganismide elutegevus (Kornjacki *et al.* 2011).

#### 1.4.1. Mikrobioota kooses

Rõõsakoore kvaliteedi määrab suuresti toorpiima kvaliteet. Mida hügieenilisemalt on piim toodetud seda parema kvaliteediga saadakse valmistoote. (Fernandes 2009: 42) Rõõsakoore mikrobiootasse kuuluvad põhiliselt spoore moodustavad termoresistentsed mikroorganismid. Enim on esindatud perekond *Bacillus* liigid – *B. subtilis*, *B. cereus* jt (Walstra *et al.* 2006). Need on enamasti kuumuskindlad ja võimelised elutegevust jätkama ka pärast koore pastöriseerimist. Tekitades koorele erinevaid maitse, lõhna ja tekstuuri vigu, näiteks *B.*

*cereus*'e elutegevuse tagajärjel võib koor kalgenduda. Kõrgkuumutamist ehk UHT taluvad mikroorganismid on *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. Subtilis*, kelle elutegevuse käigus võib tekkida tekstuuri (koor muutub paksuks) ja maitse vigu (koor muutub kibedaks). Lipolüütilised mikroorganismid on rasvarikaste toodete puhul enim riknemist põhjustavateks mikroobideks. Põhilised on *Pseudomonas* perekonda kuuluvad psührotroofsed liigid *P. fluorescens*, *P. fragi*. (Fernandes 2009: 43) Antud mikroorganismid on sanitaarhügieenilisteks indikaatoriteks, mis lagunevad pastöriseerimisel, kuid nende sattumisel tootesse on nad võimelised paljunema piimatoodete säilitamise temperatuuridel +4...+6° C (Suryavanshi, Ghosh 2010).

Hallitus- ja pärmseened on koore mikrobiotas harva esinevad. Mõned pärmiliigid nagu *Torula cremoris*, *Candida pseudotropicalis* ja *Torulopsis sphaerica* võivad koorde sattudes tekitada maitse ja tekstuuri vigu, milleks võib olla pärmi ja puuvilja maitse ning on võimelised produtseerima gaase. (Fernandes 2009: 43)

#### **1.4.2. Mikrobioota võis**

Olenevalt või liigist on lubatud mikrobioloogiline kooslus ainult juuretise baasil saadud hapukoorevõis (Elias, P., Elias, A. 2004: 125), kus juuretiskultuurid lisatakse võisse sissepressimise meetodil tuntud kui NIZO meetod (Poikalainen 2004: 114). Põhilised mikroorganismid juuretise koostises on *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ja *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. (Kornjacki *et al.* 2011)

Rõõsakoorevõi mikrobioota koosneb tervenisti saastemikroorganismidest ning või pH >6,2 võimaldab areneda enamikel valke ning rasvu lagundavatel liikidel. Põhilised mikroorganismid on siin hallitus- ja pärmseened, bakterid sh. psührotroofid ja patogeendid. (Fernandes 2009: 55)

Hallitus- ja pärmseened satuvad võisse enamasti sekundaarsel saastatusel. Need mikroorganismid ei kujuta ohtu võitoodetele kuna nende vegetatiivsed rakud ja spoorid lagunevad pastöriseerimisel. Põhilised saasteallikad tootmisel on tootmisosakonna õhk, ebapuhas pakkematerjal ning ebakvaliteetselt pestud seadmed ja inventar. (Elias, P., Elias, A. 2004)

Hallitusseened on aeroobsed organismid mistõttu on nad võimelised kasvama ainult või pinnal, põhjustades maitsevigu ning osadel juhtudel ka pinnale tekkivaid musti laiike.



(Fernandes 2009: 55) Nende optimaalseks kasvutemperatuuriks on 15-25° C ning madalamatel temperatuuridel elutegevus aeglustub, mis aga temperatuuri tõustes taas intensiivistub. (Elias, P., Elias, A. 2004). Enim esineb liike perekondadest *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Alternaria*, ja *Rhizopus* (Fernandes 2009: 55).

Pärmseened on võimelised arenema nii aeroobses kui anaeroobses keskkonnas (Elias, P., Elias, A. 2004). Mõned lipolüütilised mikroobid nagu näiteks *Rhodotorula*, on suutelised arenema ka kõrge soolakontsentratsiooniga elukeskkonnas põhjustades maitsevigu (Fernandes 2009: 55).

Patogeensetest mikroobidest on olulisem märkida *L. monocytogenes*'t, mis on võitoodetes kõige enam kajastust leidnud. Ta on grampositiivne, fakultatiivne mikroorganism, kellel on võime kasvada ja areneda aeroobses keskkonnas ja laiades (+1...+45° C) temperatuurivahemikes. (Azizoglu, Kathariou 2010) Lyytikäinen *et al.* (2000) uurisid listerioosi puhangut Soomes 1998. aastal, kus leidis aset haiguspuhangu juhtum haiglas. Seal haigestusid patsiendid, kes olid tarbinud 29 g pakendatud võid lõunasöögiajal. Listerioosi nakatumise tagajärele surid 6 inimest. (Lyytikäinen *et al.* 2000)

Listeria puhul on oluline märkida, et ta on võimeline paljunema ka külmkapitemperatuuril. Antud asjaolu teeb ta eriti ohtlikuks, kuna lihtsalt külmkapis hoidmisel madala *L. monocytogenese* sisaldusega toode, mis tervet inimest ei nakataks, võib muutuda *L. monocytogenese* kõrgeks kontsentratsiooniks poolest haigestumist põhjustavaks. (Walstra *et al.* 2006: 193, Kornjacki *et al.* 2011: 142)

Patogeensetest organismidest võib võis esineda veel *C. jejuni*, mida võib leida tihti loomsetes fekaalides. Ta on spiraalse kujuga ja kuulub gramnegatiivsete bakterite hulka. *Campylobacter* on indikaator organism, kellele mõjub madalatel pastöriseerimisrežiimidel töötlemine letaalselt. (Walstra *et al.* 2006: 192) *C. jejuni* on leitud küüslauguvõid sisaldavas prantsuse leivas, mis põhjustas 4 inimese haigestumise (Zhao *et al.* 2000).

*E. coli* ja *Salmonella* on samuti tuntud patogeendid, kes võivad võis esineda. Nad kuuluvad *Enterobacteriaceae* sugukonda ning on pulgakujulised fakultatiivsed aeroobsed mikroorganismid. Neile mõjub pastöriseerimine letaalselt. (Walstra *et al.* 2006: 192) *Salmonella* võib areneda võis temperatuuril 25° C, säilitades arenguvõime ka külmkapitemperatuuril (Holliday *et al.* 2003). *S. aureus* on kokikujuline ja kuulub grampositiivsete bakterite hulka. Põhiliselt leidub teda lehma udara mikrobiotas ja nahkkoos, olles ohtlik, kui loomal on haiguslik mastiit ehk udarapõletik. Pastöriseerimisel antud mikroob kaotab eluvõimelisuse. (Walstra *et al.* 2006: 193)

## 1.5. Tehnoloogiliste etappide mõju mikroobide arengule võis

Või on kontsentreeritud piimarasv. Rasvakuulikesed on vastuvõtlikud igasugustele maitse- ja lõhnaühenditele. Sellest tulenevalt peab koor, kui või valmistamise lähteaine olema eriti kvaliteetne. Või säilivust mõjutavad lisaks lipolüüsile ka oksüdatsiooni protsessid. (Poikalainen 2004)

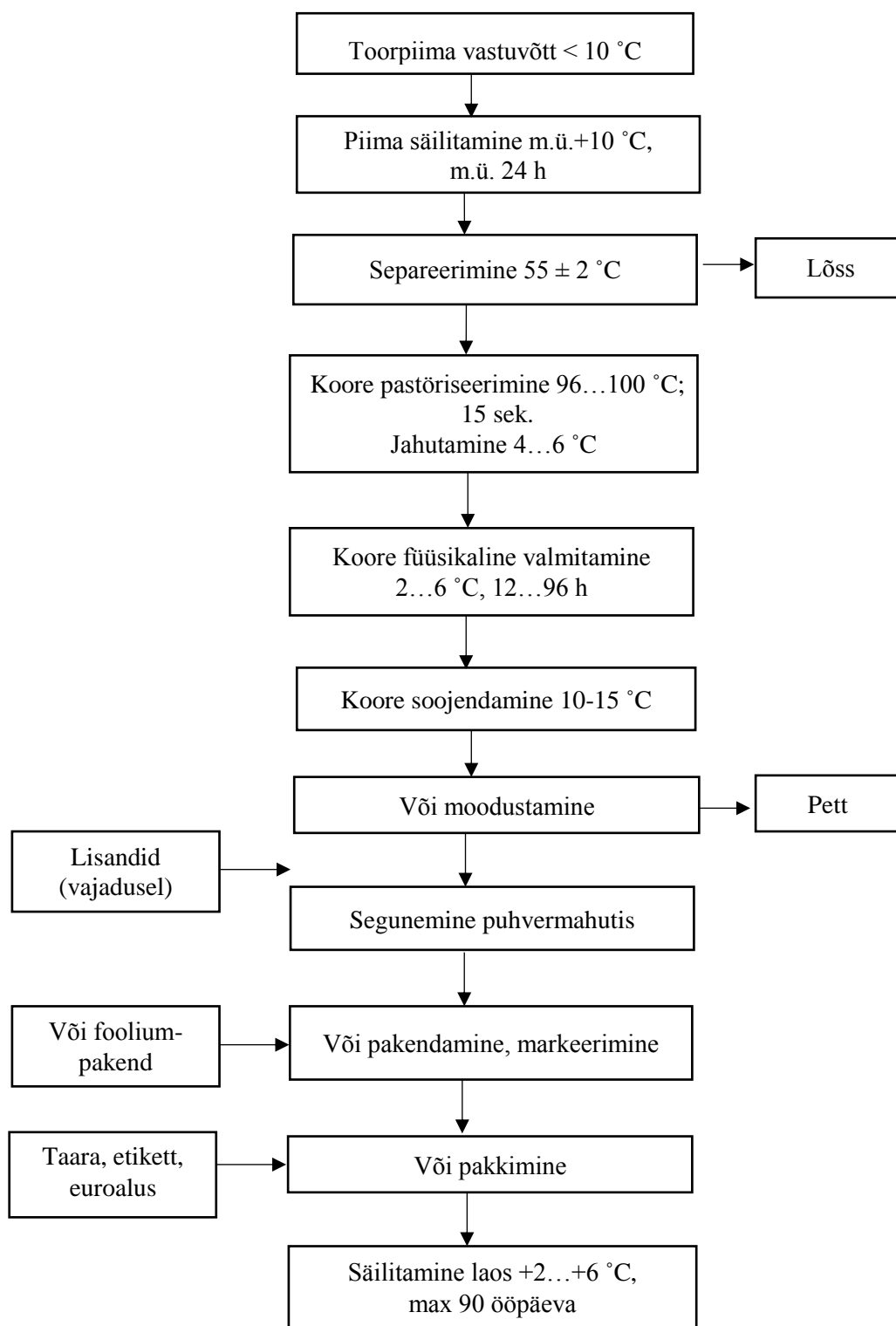
Või mikrobioloogilise kvaliteedi omaduste parandamisele aitavad kaasa õigesti valitud tehnoloogilised etapid koos õigete parameetritega (joonis 1). Erinevates tehnoloogilistes etappides võivad tekkida ohud, millega luuakse head eeltingimused mikroorganismide elutegevuseks. Olulisemateks etappideks on separeerimine, seejärel koore pastöriseerimine ning võitera pressimine. Mikrobioloogiline saastatus või valmistamisel võib tekkida igas etapis. (Kornjacki *et al.* 2011)

Mikrobioloogilise kvaliteedi tagamisel on eelistatav kasutada baktofuug-separaatorit, millega saame eemaldada suurema osa piima algsest mikrobiootast. (Kornjacki *et al.* 2011)

Pastöriseerimata piima eelsoojendatakse enamasti separeerimistemperatuurile 40° C. Sellel temperatuuril on toorkoores olevad mikroorganismid aktiivsed kasvama ja arenema. Põhiliseks ohuks või kvaliteedile on koores sisalduvad lipaasid, põhjustades lipolüüsi. Lipolüüsi tulemusena tekib võile erinevaid maitsevigu. Seetõttu tuleks toorkoor koheselt peale separeerimist pastöriseerida. (Poikalainen 2004: 18,57)

Koore pastöriseerimisel kasutatakse kõrgemaid temperatuure võrreldes piimaga. Kõrgem temperatuur tuleneb sellest, et koore rasvasus on kõrge, jäädes enamasti 35% juurde. Rasv on viskoosse tekstuuri tõttu halb soojusjuht ning selle tõttu väheneb temperatuuri mõju mikroorganismidele. (Abiks... 2012; 111)

Koore pastöriseerimisega surutakse alla patogeenne mikrobioota, inaktiveeritakse lipolüütilised ja proteolüütilised ensüümid. Pastöriseerimiseks vajalik temperatuur valitakse vahemikus 95 – 110° C, kus bakterid hävivad 10 – 30 sekundi jooksul. Nende temperatuuride kasutamisel saame hävitada valke lagundavad *Bacillus* perekonna liigid (*B. subtilis*, *B. mesentericus* jt) ja lipolüütilised ensüümid, mis lagunevad temperatuuridel üle 95° C. Sekundaarsest saastatusest pärinevad mikroorganismid (kolibakterid, pärmseened, hallitusseened) hävivad juba temperatuuril 85° C (Mandel 2001).



**Joonis 1.** Või valmistamise tehnoloogiline skeem (Mandel 2001; Budhkar *et al.* 2014)

Või pressimine on tehnoloogiline etapp, mille eesmärgiks on eraldada võiterade vaheline plasma ja reguleerida veesisaldust. Pressimisega dispergeeritakse võiplasma ühtlaselt üle kogu võimassi laiali. Tähtis on seejuures plasmapiisakeste suurus, mis ei tohiks olla suurem

kui 10 µm (Krause 2006). Plasmapiisakesed, mis on väiksemad kui 7, µm on mikroobidele ebasoodne kasvukeskkond ning nende elutegevus seiskub, samas kui 100 µm suurused piisakesed loovad mikroobidele ideaalsed tingimused intensiivseks kasvuks ja paljunemiseks (Poikalainen 2004: 155). Halvasti dispergeeritud võiplasma puhul luuakse head kasvutingimused lipolüütiliste mikroorganismide elutegevuseks. On täheldatud, et mikrobioloogiline riknemine on tihedalt seotud vee kogusega võis. Ka oksüdatsiooniprotsessid olenevad vee jaotusest ja dispergeeritusest kuna antud reaktsioonid toimuvad vee ja rasva piirpinnal (Elkhhidir 2003).

Või pakkimine on tehnoloogiline etapp, mis on potentsiaalseks ohuks mikroobidega saastumisel valmistootes, mistõttu või pakitakse koheselt pärast valmistamist. Olenevalt tarbimisvajadustest pakitakse või väikepakendisse ehk tarbijapakendisse, mille suurus jääb vahemikku 10 - 500 g. Pikemaajaliseks säilitamiseks pakitakse või kilega vooderdatud pappkastidesse (lõppkaaluga 20 - 24 kg), mis säilitatakse -20 °C temperatuuril. Antud tehnoloogilises etapis tuleb kasutada mikrobioloogiliselt puhtaid pakendeid ja pakkeseadmeid ning tähelepanu tuleks pöörata pakkematerjali ning personali hügieenile. (Poikalainen 2004, Mandel 2001).

Või säilitamine ja hoiustamine on tähtis või edasise kvaliteedi hoidmise seisukohast. Hoiustamisel tuleb jälgida säilivusaja ja temperatuuri suhet (tabel 4). Võid säilitatakse olenevalt säilitamise vajadusest temperatuuridel +4...+8 °C, pikemaajalisel säilitamisel ka -20 °C. Krause *et al.* (2008) uurisid või säilivust, kus võid säilitati sügavkülmutatult temperatuuril -20 °C ja külmkapitemperatuuril +6 °C ja Teder (2016) uuris või säilivust ka +20 °C. Katses võeti sügavkülmutatud võist proovid viiel korral, vastavalt 0, 6, 12, 15 ja 24, ning jahutatud võist seitsmel korral vastavalt 0, 3, 6, 9, 12, 15 ja 18 kuiste intervallidega. Toatemperatuuril +20 °C juures säilitati võiproove 8 nädalat. Uuringust selgus, et või säilitamisel -20 °C säilib see 12 kuud ning temperatuuril +6 °C säilib 6 kuud ilma, et maitse ja lõhna omadused muutuksid. Säilitamisel +20 °C juures peale 4 nädalat tekkis võile eraldunud rasv, kuid maitse omadused oluliselt ei muutunud.

**Tabel 4.** Või säilivusaeg sõltuvalt temperatuurist (FSD 2000)

Või liik	Säilitusviis	Külmkapis (2 – 4 °C)	Sügavkülmas (-18 °C)
Soolatud või	Kinnine pakend	2 kuud	6 – 9 kuud
Rõõsakoorevõi	Kinnine pakend	2 nädalat	5 kuud

Käesoleval hetkel ei ole Eestis ühtset normi toiduainete säilivustingimuste kohta ning iga tööstus teostab uutele toodetele kestvuskatsed ise. Kestvuskatsetega saavutatakse ja dokumenteeritakse igale tootele kindel säilivusaeg teatud temperatuuri juures. Kestvuskatsetel mõõdetakse toote organoleptilisi ja füüsikalisi-keemilisi näitajaid ning hinnatakse lisaks ka mikrobioloogilist kvaliteeti. (Toiduseadus § 22 lõige 2)

## **1.6. Lipolüüs ja selles osalevad mikroorganismid**

Lipolüüs toimub vee ja rasva piiripinnal, kus rasvad lõhustatakse lipaaside toimel. Lipolüütilise reaktsiooni tagajärjel vabanevad vabad rasvhapped ja glütserool. Selle reaktsiooni aktiivsus oleneb eelkõige veest, kuid ka temperatuurist ja pH'st. Lipolüütilistele ensüümidele on kõige optimaalsemaks temperatuuriks 40 - 50 °C. Lipaasid on aktiivsed nii aluselises kui ka happelises keskkonnas, olles võimelised lõhustama rasvhappeid nii rõõsakoore-, kui ka hapukoorevõis. (Poikalainen 2004)

Piimhappebakteritest on kõige intensiivsema lipolüütilise aktiivsusega mikrokokid. (Poikalainen 2004: 19) Enamasti on kõrge lipolüütilise aktiivsusega hallitus- ja pärmseened, näiteks hallitusseentest *Geotrichum* spp. ning pärmseentest *Candida lipolytica*, *C. parapsillosis* (Salem 2009). Enamik lipaasidest lahutab glütseroolist servmisi rasvhappeid neid selekteerimata, kuid *G. candida* toodab lipaasi, mis suudab selekteerida oleiinhappe jt küllastumata rasvhapped glütseroolist (Poikalainen 2004: 19). Tavaliselt säilitatakse piima ja piimatooteid temperatuuril +2...+5 °C. Lipolüütilised mikroorganismid on võimelised tootma lipaasi ka külmkapi tingimustel, põhjustades toodete riknemist. Suryavanshi ja Ghosh'i (2010) uuringust selgus, et rõõsakoorevõist isoleeritud *Pseudomonas aeruginosa* optimaalne kasvutemperatuur on pH 7 juures +5 °C. Antud pH on rõõsakoorevõile omane. *P. aeruginosa* bakteri olemasolu mõjutab või kvaliteeti ja säilivust, produtseerides rasvu hüdrolyüsivat ensüümi lipaasi, mille tulemusel tekib võile ebameeldiv lõhn ja maitse.

## **1.7. Tootmishügieen**

Toiduainete tootmisel tuleb jälgida tootmishügieeni tulenevalt nii tootmisest kui ka personalist. Tootmishügieeni jälgimisel tuleb vältida ristsaastumist peale kriitiliste

kontrollpunktide läbimist. (Roasto *et al.* 2011: 182) Pärast koore pastöriseerimist on eriti oluline, et või ei saastuks võõrmikrobiootaga (Elias, P., Elias, A. 2004: 136).

Lyytikäinen *et al.* (2000) leidsid oma uurimustöös, kus uuriti listerioosi puhangut Soomes, et *L. monocytogenes* sattus võisse või valmistamise seadmetest pärast koore pastöriseerimist. Tootmishügieeni rikkumise põhilisteks indikaatororganismideks on enterobakterid sh. *E. coli*, aga ka, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ja *Salmonella* jm. Nimetatud bakterid on patogeensed, kuid need hävinevad pastöriseerimise temperatuuril. (Lyytikäinen *et al.* 2000; Kornjacki *et al.* 2011:144) Või valmistamisel peab jälgima ja teostama kontrolli, et kõik protsessis kasutatavad seadmed ja inventar oleks valmistatud roostevabast terasest, olema kergesti puhastatavad, pestavad ning desinfitseeritavad. Samuti on suur roll tootmisruumi õhu puhtusel ja töötajate hügieeni teadlikkusel ning sanitaarriietusel. (Lyytikäinen *et al.* 2000)

## **1.8. Erinevate maitselisandite mõju või mikrobioloogilisele kvaliteedile**

Lisanditega või tootmisel on oluline pöörata tähelepanu lisandi mikrobioloogilisele kvaliteedile. Meelisandiga või tootmisel tuleks mesi eelnevalt pastöriseerida kuna mesi sisaldab rasvu lagundavaid lipaase. (Kornjacki *et al.* 2011) Maitselisandid, mida võis enim kasutatakse, on sool, vürtsid ja ürdid. Definiitsiooni järgi on vürtsid erinevate taimede kuivatatud osad nagu seemned, õied, juured, koor, marjad jms. Ürtideks nimetatakse taimede kuivatamata lehti, mida kasutatakse põhiliselt värskena, lisamaks toidule aroomi ja maitset. (EFC 2003 s.v . Herbs And Spices)

### **1.8.1. Sool**

Elkhir (2003) on kirjutanud, et soolatud või on parema kvaliteediga kui rõõsakoorevõi, mis tõenäoliselt tuleneb sellest, et kõrge soolasisaldus võis raskendab vaba vee kättesaadavust mikroorganismidele. Fuquay *et al.* (2011; 713) näitas, et soolatud või veeaktiivus ( $a_w$ ) jääb vahemikku 0,91 - 0,93, mis on võrreldes rõõsakoorevõiga oluliselt madalam ( $a_w > 0,99$ ). Soolatud või puhul tuleb jälgida soola kontsentratsiooni ning peab arvestama mikroobide füsioloogilist aspekti. Näiteks 3% soolasisaldusega või inhibeerib enamik patogeensete mikroorganismide elutegevust (va. *S. aureus*), samas kui või 1% soolasisaldus mõjub mikroobide arengule soodsalt, lühendades sellega märkimisväärselt või säilivusaega.

(FDA 2014) Säilivusaja valikul tuleb lähtuda soolatud võiliigi puhul säilitustemperatuurist. Soolatud või säilib plusskraadidel paremini kui soolamata või. Pikemaajaliselt tuleks soolatud võid säilitada -5 °C temperatuuril ja alla selle, kuna soola lisamine alandab võiplasma jäätumistemperatuuri. (Poikalainen 2004)

Iga lisandi puhul tekib oht ristsaastumiseks ning see kehtib ka soolatud või valmistamisel. Sool peab olema puhas, kvaliteetne ning soolvesi, mida toote valmistamisel kasutatakse, tuleb eelnevalt pastöriseerida. (Poikalainen 2004)

### 1.8.2. Maitsetaimed

Maitsetaimedest on kõige enam kasutust leidnud lauguliste perekonda kuuluv küüslauk (ld.k: *Allium sativum*). Esmalt on laugulisi kasutatud ravimi eesmärgil, kuid eriti tänapäeval on need erinevates toiduainetetööstustes laialt levinud. Neid kasutatakse kulinaarsetel eesmärkidel toodetele iseloomuliku maitse andmiseks, kusjuures on oluline, et see ei tekitaks toodetes mikrobioloogilist saastumist. (Kociã-Tanackov *et al.* 2009) Populaarseks on saanud karulaugu (ld.k: *Allium ursinum*) kasutamine, mida tuntakse ka mets-küüslaugu nime all. Lauguliste keemilisse koostisesse kuuluvad antibakteriaalse toimega ained peamiselt allitsiin, ensüüm, mis mõjub mikroobide kasvule inhibeerivalt. Laukude antibakteriaalset toimet on täheldatud peamiselt *Candida* spp., mis kuuluvad pärmseente perekonda (Bagiu *et al.* 2012) ning inhibeerivaid omadusi hallitusseente *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* jt liikidel paljunemisele. (Pârvu *et al.* 2011) Adler ja Beuchat (2002) on uurinud küüslaugu letaalsel mõju sellistele mikroorganismidele nagu *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 ja *L. monocytogenes*. Uuringus leiti seoseid erinevate temperatuuride ja küüslauguliikide vahel. Antud artiklis toodi välja, et hiidküüslaugul on võrreldes *E. coli* O157:H7 tüvega suurem inhibeeriv toime *Salmonella*'le ja *L. monocytogenes*'ele. Kuivatamata maitseainetel ja ürtidel oli varemalt Vabariigi Valitsuse poolt kehtinud määruse nr 166 alusel lubatud mikroobide üldarv jääda  $5 \cdot 10^7$  PMÜ/g.

Tänapäeva toiduainetetööstuses on tomat saavutanud suure populaarsuse. Kasutusel on maitseainete segud, kuhu tomat on lisatud nii maitsenüansside rikastamiseks, kui ka tootele isuäratava välimuse andmiseks. (Shi, Le Maquer 2000) Tomati kõrge veesisalduse pärast (ca 90%) kasutatakse seda peamiselt kuivatatult. (Correia *et al.* 2015) Kuivatatud köögiviljadele on esitatud ka mikrobioloogilised nõuded varem Vabariigi Valitsuse poolt kehtinud määruses nr 166 – lubatud mikroobide üldarv  $10^4$  PMÜ/g.

Kuivatusprotsesside juures jälgitakse töötluste parameetreid, et pärast töötlust säiliks tootel bioaktiivsed ained. Tomat sisaldab rasvlahustuvaid vitamiine A ja E ning vees lahustuvat vitamiini C, mineraalainetest kaaliumi, kaltsiumi ja fosforit. (George *et al* 2011) Tomatile iseäraliku punase värvuse annab lükopeen, mis on antibakteriaalse toimega ning mille omastatavus on hea eelkõige rasvase toiduga (Shi, Le Maquer 2000). Lükopeeni antimikroobset toimet on uuritud erinevatel mikroorganismidel. Antud ensüümil on leitud inhibeerivat mõju nii gramnegatiivsetele mikroobidele nagu *P. aeruginosa*, *E. coli* ja *Acinetobacter* (AL - Oqaili *et al.* 2014) kui ka grampositiivsele spoore moodustavale bakterile nagu näiteks *B. subtilis* (Umar *et al.* 2016).

## 1.9. Mikroobide osalusel tekkivad vead võis

Mikroobide osalusel tekkivad vead on seotud tihtipeale ka võis toimuvate keemiliste ja füüsikaliskeemiliste protsessidega. Enamasti tekivad vead valke ja rasvu lagundavate ensüümide tagajärjel. (Elias, P., Elias, A. 2004) Tabelis 5 on kirjeldatud vastavalt mikroorganismile või grupile tekitatud vead võis.

**Tabel 5.** Mikroorganismide osalusel tekkivad vead võis

Vea kirjeldus	Mikroorganism	Viide
Käärimis-, hapu või leeliseline maitse	Kolilaadsed bakterid	Elias 2004
Pinnal mustad täpid	<i>Cladosporium</i> spp. <i>Torula</i> spp., <i>Pseudomonas nigricans</i>	Robinson 2002 Kornjacki <i>et al</i> 2011 Suryavanshi 2010
Puuvilja maitse	<i>P. fragi</i>	Elias 2004
Kibekas, kalamaitse	<i>P. fluorescens</i>	
Roiskunud lõhn	<i>P. mephitica</i>	Fernandes 2009
Kibekas-, linnase-, söödamaitse	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> var <i>maltigenes</i>	Fernandes 2009
Juustu maitse	<i>P. putrefaciens</i>	Elias 2004
Hallituse-, kibe-, seebimaitse	Hallitusseened	
Pärmi või ebapuhas maitse	<i>Geotrichum candidum</i>	
Metalli- või rasvamaitse	<i>Candida mycoderma</i>	

Või riknemisele on enamasti kaasatud mikroobide poolt produtseeritud ensüümid. Ensüümid jagunevad lipaasideks, proteaasideks jms. Võitehnoloogias on selleks lipaasid, mis lõhustavad



rasvhappeid ning riknemisel tekivad enamasti erinevad maitse ja lõhna vead. (Poikalainen 2004)

## 1.10. Mikrobioloogilised nõuded või tootmisel

Tänapäeval rakendatakse või tootmisel mikrobioloogilisi nõudeid, mis on kehtestatud EÜ määruses nr. 2073/2005. Antud määruse toiduohutuskriteeriumi kohaselt on toiduohutusindikaatoriks *L. monocytogenes* (lubatud piirnorm on 0 PMÜ/g) ja hügieenikriteeriumites on sanitaartingimuste indikaatorliigina märgitud *E. coli* (lubatud piirnorm on 10 PMÜ/g). Määruses on välja toodud nõuded võile ja koorele, mis on valmistatud toorpiimast või mida on kuumtöödeldud madalamatel temperatuuridel, kui pastöriseerimine. Määruses 2073/2005 pole välja toodud mikrobioloogilisi nõudeid, mis käsitleksid otseselt pastöriseeritud piimast ja koorest valmistatud võid. Varem kehtinud määruse (tabel 6) andmeid käesolevaga kõrvutades näeme, et varem neljandasse rühma arvatud patogeensed mikroorganismid *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, kelle lubatud piirnorm tootes on 0 PMÜ/g, on määruses 2073/2005 nimeliselt välja toodud ning nende esinemine toidus pole jätkuvalt lubatud. (Vabar... nr 166)

**Tabel 6.** Lubatud piirnormid mikroobide suhtes (Vabar... nr 166),

Või liik	Mikroorganism/ mikroorganismide grupp	Suurimad lubatud sisaldused tootmispäeval				Mikroorganismide suurimad lubatud sisaldused toidus standardiseerimata analüüsimise ajal
		n	c	m	M	
<b>Pastöriseeritud rõõskkoor</b>	Mesofiilsed aeroobid	5	1	5x10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
	<i>Coli</i> -laadsed bakterid	5	2	0	5	5
	<i>Listeria</i>	5	0	0	0	0
	<i>monocytogenes</i>					
	<i>Bacillus cereus</i>					10 <sup>4</sup>
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0	0	0
	Rühm 4 *					0
<b>Või</b>	<i>Coli</i> -laadsed bakterid	5	2	0	10	10
	<i>Listeria</i>	5	0	0	0	0
	<i>monocytogenes</i>					
	Hallitusseened					10 <sup>3</sup>
	Pärmseened					10 <sup>3</sup>
	Rühm 4 *					0

*Märkused:* \*Rühm 4 – otseselt haigustekitajad mikroobid inimorganismile; tabelis sisalduvate lühendite kirjeldused on lahti seletatud tabel 7 allmärkustes

Varem jälgiti Eestis mikrobioloogilisi nõudeid, mis olid kehtestatud Vabariigi Valitsuse määruses nr 166. Antud määrus on mitmete ettevõtete enesekontrolliplaanis proovivõtukava koostamisel aluseks ka praegu.

Vastavaid mikrobioloogilisi nõudeid on kirjeldatud mitmetes artiklites. Järgnevas tabelis 7 on toodud välja erinevate artiklite põhjal või mikrobioloogilised piirnormid.

**Tabel 7.** Või mikrobioloogilised kvaliteedinõuded mujal maailmas

Või liik	Määratletavad mikroorganismid	n*	c**	m***	M****	Kirjandus allikas
Soolane ja soolamata või	Bakterite üldarv 35 °C (PMÜ/g)	5	2	2,5 x 10 <sup>4</sup>	2,5x 10 <sup>5</sup>	Food Administration Manual 1995
	<i>Staphylococcus</i> (PMÜ/g)	5	0	0		
	Kolilaadsed	5	2	50	5 x 10 <sup>2</sup>	
	<i>L. monocytogenes</i> (PMÜ/25g)	5	0	0		
	<i>Salmonella</i> spp. (PMÜ/25 g)	5	0	0		
	Pärm- ja hallitusseened (PMÜ/g)	5	2	50	5 x 10 <sup>2</sup>	
Või	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	-	0/25g	László Varga 2007
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	-	0	
	Kolilaadses	5	2	1	10	
Või pastöriseeritud koorest	<i>Enterococci</i> (PMÜ/g)	5	1	10	10 <sup>2</sup>	FDA 2013
	Hallitused/pärmid (PMÜ/g)	5	1	20	10 <sup>2</sup>	
Või pastöriseerimata koorest	Proteolüütilised bakterid (PMÜ/g)	5	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	FDA 2013
	Kolilaadsed (PMÜ/g)	5	1	10	10 <sup>2</sup>	
	<i>S. aureus</i> (koagulaas+) PMÜ/g	5	0	10 <sup>2</sup>	-	
	Psührotroofsed bakterid (PMÜ/g)	5	1	10	10 <sup>2</sup>	
	Mikroobide üldarv (PMÜ/ml)	5	1	5 x 10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	
Või pastöriseeritud koorest	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	0	10	Ledenbach; Marshall 2009
Soolatud ja soolamata pastöriseeritud või	Mikroobide üldarv	5	1	50 000	100 000	
	Kolilaadsed	5	1	10	100	
	Psührotroofsed bakterid	5	1	10	100	
Või pastöriseeritud koorest	Aeroobsed mesofiilid (PMÜ/ml)	5(3)	3	25 x 10 <sup>3</sup>	50 x 10 <sup>3</sup>	Food Safety and Standards Authority of India 2015
	Kolilaadsed	5(3)	2	- /0,1 g	20/g	
	<i>S. aureus</i> (koagulaas+) PMÜ/g	5(3)	2	10/g	50/g	
	Pärm- ja hallitusseened	5(3)	3	20/g	50/g	

**Märkused:** \* (n) osaproovide arv üheks uuringuks; \*\* (c) osaproovide arv, milles uuringu käigus määratud mikroorganismide kolooniate arv g või ml kohta võib jääda väärtuste **m** ja **M** vahele; \*\*\* (m) mikroorganismide kolooniate arv g või ml kohta, mille samaväärse või väiksema koguse korral kõigis osaproovides loetakse toit mikrobioloogilistele nõetele vastavaks; \*\*\*\* (M) suurim toidus lubatud mikroorganismide kolooniate arv g või ml kohta. Toit loetakse mikrobioloogilistele nõuetele mittevastavaks ja toidukõlbmatuks, kui mikroorganismide kolooniate arv enamates kui **c** järgi lubatud osaproovides on võrdne väärtusega **M** või sellest suurem

Või mikrobioloogilise kvaliteedi hindamisel kasutatakse Eesti Vabariigis piimatoodete mikrobioloogilistel analüüsidel järgnevaid standardeid:

- EVS-EN ISO4833-1:2013 – Toiduahela mikrobioloogia. Mikroorganismide loendamise horisontaalne meetod. Osa 1: Kolooniade loendamine sügavkülvitehnikat kasutades temperatuuril 30 °C.
- EVS-EN ISO 4832:2010 – Toidu ja loomasöödade mikrobioloogia. Horisontaalmeetod *coli*-laadsete arvuliseks määramiseks. Kolooniade loendamise meetod (ISO 4832:2006).
- EVS-EN ISO 6611:2011 – Piim ja piimatooted. Pärmide ja/või hallituste kolooniaid moodustavate ühikute arvuline määramine. Kolooniade loendamise meetod temperatuuril 25 °C (ISO 6611:2004).
- EVS-EN ISO 707:2008 – Piim ja piimatooted. Proovivõtjuhend.
- EVS-EN ISO 6887-5:2010 – Toidu ja loomasöödade mikrobioloogia. Katseproovide, algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste valmistamine mikrobioloogiliseks uuringuks. Osa 5: Erieeskirjad piima ja piimatoodete ettevalmistamiseks.
- NMKL 44(6):2004 – Kolilaadsed bakterid. Arvuline määramine toidus ja loomasöötas. Coliform bacteria. Determination in foods and feeds.

Antud standardid on koostatud Euroopa standardite põhjal ja tõlgitud eesti keelde. Standardites on kirjeldatud erinevate meetodite kasutamist erinevate mikroobide määramiseks. EVS-EN ISO 707:2008 standard käsitleb piima ja piimatoodete proovivõtmist, kus on kirjeldatud põhilised proovivõtmise tehnikad ja vahendid. EVS-EN ISO 6887-5:2010 standardis, „Toidu ja loomasöödade mikrobioloogia: Katseproovide, algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste valmistamine mikrobioloogiliseks uuringuks“ kirjeldatakse piima ja piimatoodete ettevalmistamist laboratoorselt.

#### **1.10.1. Mikroobide üldarvu määramine**

Mikroobide üldarvuga määratakse organisme, kes armastavad enamasti mesofiilset kasvukeskkonda (Collins, Lyne 2004).

Põhiliselt annab mikroobide üldarvu määramine teada, kui saastunud samas aga ka kui kvaliteetne on antud toode. Mikroorganismid, mis siia alla kuuluvad on enamasti tööstuse

sanitaar-hügieenilised näitajad ning antud mikroobe esindavad *S. aureus*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *Salmonella*, *Shigella* spp. (Elias, P., Elias A. 2004)

Mikroobide üldarvu määramiseks võis võetakse aseptiliselt 10 g võiproovi steriilsesse nõusse, mis sulatatakse 45 °C juures vesivannil. Seejärel lisatakse sulanud proovile 90 ml steriilset peptoonlahust ning saadakse esimene kümnendlahjendus ehk  $10^{-1}$ . Järgnevalt võetakse esimesest lahjendusest 1 ml lahust, mis pipeteeritakse järgmisesse 9 ml steriilset peptoonlahust sisaldavasse testtubi ja saadakse teine lahjendus  $10^{-2}$ . Antud tegevust korratakse nii palju kui mitu korda on vaja võiproovi lahjendada. (Ahmed *et al.* 2015)

Üldarvu määramisel Petri tassidel olevad külvid inkubeeritakse 30 °C juures 72 h (Idoui, Karam 2008) Piimatoodetest mikroobide määramisel kasutatakse agarsöötmes tavaliselt 10% steriilset piima (Collins, Lyne 2004: 240). Pärast inkubatsiooni loendatakse bakterite kolooniad tassidelt, kus kolooniate arv on 30-300 pesa moodustavat ühikut milliliitris (PMÜ/ml) või grammis (PMÜ/g) proovis.

### **1.10.2. Hallitus- ja pärmseente määramine**

Pärm- ja hallitusseened on või tootmisel hügieenilise puhtuse indikaatoriteks. Enamasti on antud mikroorganismid aerofiilsed ja kasvavad põhiliselt või pinnal, kuid võivad kasvada ka halvasti dispergeerunud võiplasma piiskades. Enamasti kasutatakse hallitus- ja pärmseente määramisel agarsöödet, mis sisaldab glükoosi ja 10% viinamarihapet. Inkubeerimisaeg on 5 päeva temperatuuril 25 °C aeroobses keskkonnas. (Collins, Lyne 2004: 240)

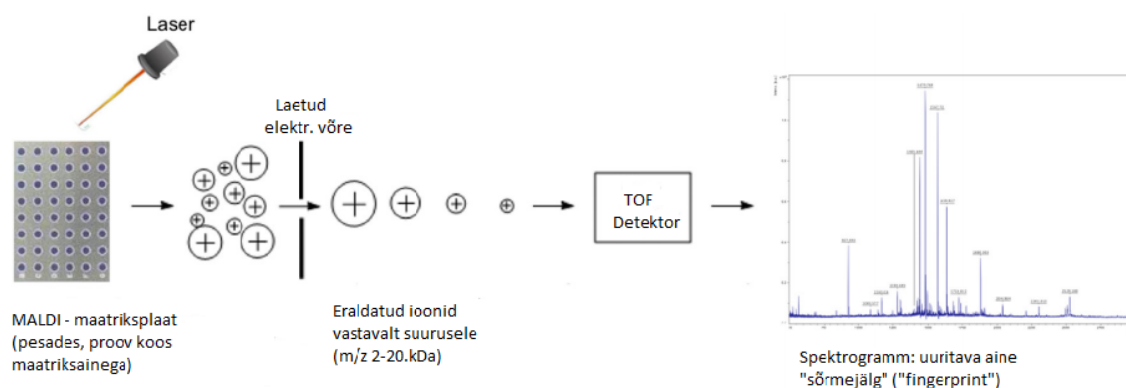
### **1.10.3. Kolilaadsete bakterite määramise meetod**

Või ei ole otseselt seotud kolilaadsete bakteritega kuna koore pastöriseerimine kõrgetel temperatuuridel hävitab nimetatud mikroorganismid. Ohtlikuks võib osutuda või tootmisel lisandite lisamine ning ebahügieenilised töövõtted, mille käigus võib toimuda ristsaastumine kolilaadsete bakteritega.

Kolilaadsed bakterid on fekaalse saastatuse indikaatorliigid ning nende mikroobide määramisel kasutatakse sappi sisaldavat söödet. Antud mikroobide optimaalseks kasvutemperatuuriks on 24 h jooksul 35-40 °C. (Fuquay *et al.* 2011: 62, Collins, Lyne 2004)

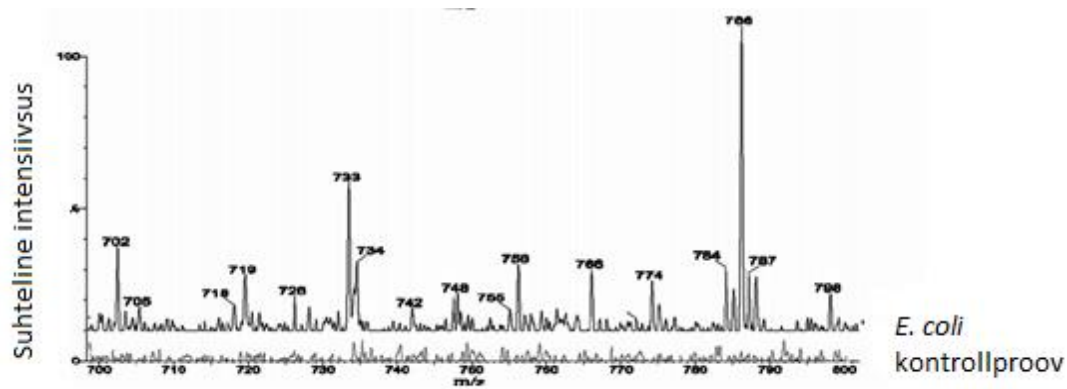
#### 1.10.4. Mikroobide identifitseerimine: MALDI-TOF

Tänapäeval on üha enam hakatud kasutama mikroobide identifitseerimisel MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization –time of flight*) mass-spektromeetriat. Meetodi laialdane kasutamine tuleneb selle lihtsusest ja tulemuste kiirel väljundil. (Singhal *et al.* 2015) Antud meetod on välja töötatud mass spektromeetriast 1980. aastal (Bizzini ja Greub 2010). Meetodi olemus põhineb laseri ja maatriksaine koosmõjul. Maatriksaine „pehmendab“ proovi, mille tulemusena proov ei lagune laseri mõjul vaid aurustub koos maatriksainega. Aurustumisel tekivad laetud osakesed ehk ioonid, mis suunatakse läbi detektori, kus fikseeritakse ioniseeritud osakese lennuaeg. Lennuaeg sõltub osakeste suurusest – mida väiksemad, seda kiirem lennuaeg ja vastupidi. Detektorist saadud info registreeritakse analüsaatoris. Arvutiekraanil kuvatakse saadud informatsioon erinevate signaali intensiivsustel tekkivate piikide abil (joonis 2). (Carolis *et al.* 2014)



**Joonis 2.** MALDI-TOF meetodi tööpõhimõte (Singhal *et al.* 2015)

Spektrogramm tekib vastavalt mikroorganismi proteoomile ehk mikroobis ekspresseeritud valkude kogumile, mis on mikroobi spetsiifiline, mistõttu igal mikroorganismil on vaid temale iseloomulik spektrogramm ehk sõrmejäl (*fingerprint*). Identifitseerimisel kasutatakse olemasolevaid andmebaase, mis sisaldavad erinevate mikroobide ainuomast mustrit ehk standardväärtusi (joonis 3). (Singhal *et al.* 2015)



**Joonis 3.** *Escherichia coli* tüvi DH5- $\alpha$  kontroll- ehk standardproov (Edwards, Kennedy 2005)

Olenevalt mikroorganismi raku ehitusest ja koostisest, kasutatakse erinevaid maatriksaineid. Kõige levinumad maatriksained on sipelghape, 2,5-di-hüdroksübensoolhape,  $\alpha$ -tsüano-4-hüdroksükaneelhape, 3,5-di-metoksü-4-hüdroksükaneelhape. Happe mõjul lõhustub rakukest, misjärel on võimalik identifitseerida mikroobid vastavalt nende valgulisele spetsiifilisusele. (Singhal *et al.* 2015)

## KIRJANDUSE ANALÜÜSI KOKKUVÕTE

Tulenevalt erinevate autorite andmetest teame, et või kvaliteet oleneb mitmetest teguritest, millest olulisemaks on lähteaine e. toorpiima kvaliteet, seejärel toorkoore kvaliteet ning alles siis tehnoloogilised etapid, keemilised reaktsioonid ja mikroobide elutegevus. Või kvaliteet oleneb tihtipeale ka või liigist kas on rõõsakoorevõi või on lisatud erinevaid lisandeid.

Olulist tähtsust või kvaliteedile omab koore pastöriseerimise efektiivsus. Pastöriseerimise efektiivsuse saavutamiseks kasutatakse temperatuuri 95–110 °C, 10-30 sekundi jooksul. Nendel temperatuuridel hävivad sekundaarsel saastumisel koore sattunud bakterid, lipolüütilised ja valke lagundavad ensüümid.

Mikroorganismidel puudub soodne kasvukeskkond rasvafaasis, kuid paraja suurusega veepiisakeste olemasolu võis loob mikroobidele head eeltingimused arenemiseks ja paljunemiseks, mistõttu vee ühtlane jaotus võis on olulise tähtsusega. Ühtlane veejaotus saavutatakse või pressimisega. Mida paremini on veepiisakesed disperseerunud rasvas ja mida väiksemad need on, seda kehvemad on mikroobide kasvutingimused.

Jälgides tootmishügieeni ning kasutades õigeid tehnoloogilisi võtteid, on pastöriseeritud koorest või valmistamisel oht mikrobioloogiliseks saastatuseks suhteliselt minimaalne. Mikrobioloogiline oht tekib aga lisanditega või tootmisel. Kirjandusest selgus, et erinevate toorürtide ja vürtside lisamisel võib tekkida oht saastumiseks hallitus- ja pärmseentega nagu ka patogeensete mikroobidega (*E. coli*, *E. aerogenes*, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*). Samuti selgus, et või mikrobioloogiline kvaliteet on olulise tähtsusega tarbijate tervise seisukohast. Saime teada, et või tarbimisel on teateid listerioosi puhangust, kus või tarbimine mõjus letaalselt 6 patsiendile Soome haiglas. Samuti on teateid ka küüslauguga või tarbimisel, kus nakatuti *C. jejuni*. Seega on või kvaliteedi määramisel hindamismetoodika õige valik olulise tähtsusega.

Kirjanduse andmetel kasutatakse või mikrobioloogilise kvaliteedi määramisel maailmas ühtseid bakterite üldarvu määramismeetodeid ning puuduvad uuendused või erisused traditsioonilise ja lisanditega või kvaliteedi hindamisel. Eestis ei ole tööstustel kohustust määrata võis bakterite üldarvu ning puuduvad ka etteantud piirnormid mikroobide sh. hallitus- ja pärmseente üldarvule, mistõttu oleks vajalik uuendada või kvaliteedi hindamise meetodeid.

Kirjanduse andmetest lähtuvalt tuleks selgitada, kui suurt ohtu kujutavad või kvaliteedile võisse lisatavad lisandid ning kas lisanditega või puhul tuleks uuendada või täiendada olemasolevaid või kvaliteedi hindamismeetodeid.



## **2. MATERJAL JA METOODIKA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Magistritöö eesmärk on võrrelda või mikrobioloogilise kvaliteedi hindamismetoodikaid mikroobide üldarvu, sh. hallitus- ja pärmseente, määramisel.

Magistritöö ülesanded:

- leida, milline on mikroobide üldarv võis;
- selgitada, kuidas mõjutab või plasmafaasi eraldamine võirasvast mikroobide üldarvu määramist;
- tuvastada, kuidas mõjutavad lisandid (soolakristallid, päikesekuivatatud tomat ja karulauk) mikroobide, sh. hallitus- ja pärmseente arvukust võis;
- anda ülevaade Eesti piimatööstustes kasutatavatest kvaliteedi kriteeriumitest võile.

### **2.2. Proovimaterjal, ettevalmistus ja meetodikad**

#### **2.2.1. Uuritav materjal**

Magistritöö uuritav materjal (proovid traditsioonilisest ja lisanditega võidest) koguti koostöös kahe erineva Eestis tegutseva piimatööstusettevõttega perioodil september 2016 kuni märts 2017. Piimatööstusest „1“ (T1) koguti proovid traditsioonilisest ning soolakristallide, päikesekuivatatud tomati- ja karlaugulisandiga võist. Piimatööstusest „2“ (T2) koguti vaid traditsioonilise või proovid (tabel 8). Kokku koguti võiproove 37. võipartiist ja viiest maitselisandi partiist (tabel 10).

**Tabel 8.** Uuritav materjal

Piimatööstus	Proovimaterjal	Tähis	Rasvasisaldus, %	Niiskusesisaldus, %	Soolasisaldus, g
T1	Traditsiooniline või	TR1	82	16	0
	Soolakristallidega või	SK	80	16	1,5
	Päikesekuivatatud tomatitega või	PT	80	14	1
	Karulauguga või	KL	70	14	1
T2	Traditsiooniline või	TR2	82	16	0

Nelja erineva võitoote (traditsiooniline ja lisanditega võid) 8. järjestikusest partiist (v. a. karulauguga või, kus koguti sõltuvalt tootmisest vaid 5 partiid) koguti proovid vastavalt võipaki suurusele 150 – 200 g, mis transporditi ning hoiustati +4...+6° C juures kuni analüüsimiseni mitte üle ühe nädala. Lisaks koguti töös analüüsitud lisanditega võide partiides kasutatud maitselisandite proovid (20-70 g) - 2 soolakristallide ja 2 päikesekuivatatud tomatitega lisandi partiiproovi, kus mõlemal juhul oli esimene partii kasutusel võipartiides I-VII ning teine partiis VIII ning 1 karulaugulisandi partiiproov (kasutusel kõigis viies võipartiis). Tootekirjelduses sisaldab PT 100 g tootes 4,0% mahus segu päikesekuivatatud tomatitest, paprikast, meresoolast, küüslaugust, röstitud sibulast, vürtsidest ning looduslikust sidruni lõhna- ja maitseainest. KL sisaldab 100 g tootes maitse segu, millest karulaug moodustab 7% ning ülejäänud muu ürdilisand (joogivesi, päevalilleõli, küüslauk, petersell, sool, kontsentreeritud sidrunimahla, stabilisaator ksantaankummi).

### 2.2.2. Proovide ettevalmistus ja meetodid

Võiproovide ettevalmistamisel võeti aluseks kaks kehtivat Eesti standardit: EVS-EN ISO 707:2008 ja EVS-EN ISO 6887-5:2010. Vastavalt standardile kaaluti 10 g võid steriilsesse tuubi ja sulatati vesivannis 45°C juures 15 minutit. Mikroobide üldarvu edasiseks määramiseks võis võeti kasutusele neli meetodit, mis eristusid plasmafaasi enam või vähem võirasvaga segunemise osas. Esimese kolme meetodi puhul tsentrifuugiti proovid steriilsetes 20 ml tsentrifuugituubides pööretel 1500 rpm 5 minutit (Idoui, Karam 2008). Neljandal meetodi korral lasti võiplasmas peale või sulamist ise settida 15 minutit (tabel 9). Meetod I puhul on tegemist nn. *in-house* meetodiga, mis töötati välja pilootkatsete raames 2016. aasta kevadel Eesti Maaülikooli toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia osakonna laboris.

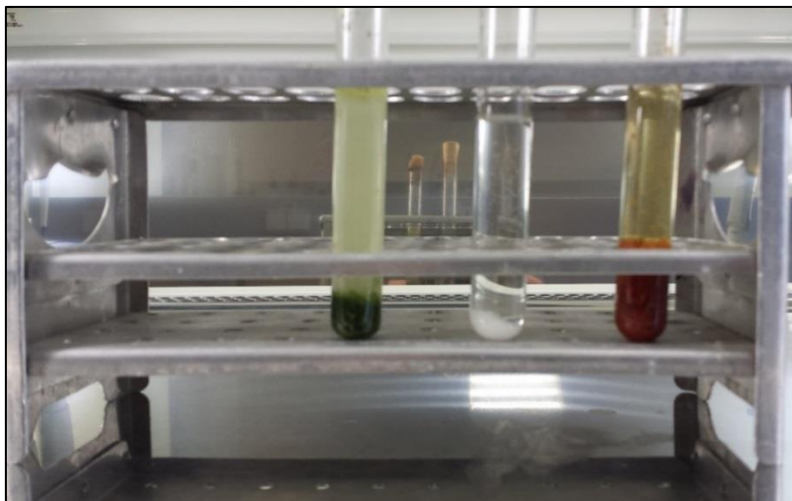
**Tabel 9.** Töös kasutatav meetodika võiproovide ettevalmistamisel

Meetod	Kirjeldus
I*	Võiproovi sisaldav tsentrifuugituub steriliseeriti pärast tsentrifuugimist (15 min 1500 rpm) 96% piiritusega. Steriilse süstlaga võeti läbi tuubi seinu või plasmafaasist 1 ml proovi steriilsesse, peptoonlahust (9 ml) sisaldavasse katseklaasi. Karulauguga või puhul lasti võiplasmat läbi süstlaga tehtud ava uude proovituubi valguda.
II	Tsentrifuugitud (15 min 1500 rpm) võiproovilt eemaldati pipetiga rasvafaas. 1 ml proovi võeti või plasmafaasist uude steriilsesse tuubi.
III	Tsentrifuugitud (15 min 1500 rpm) võiproovist võeti pipetiga läbi rasvafaasi 1 ml võiplasmat uude steriilsesse tuubi.
IV	Isetettinud tsentrifuugimata proovist võeti pipetiga läbi rasvafaasi 1 ml võiplasmat uude steriilsesse tuubi.

*Märkused:* \*Päikesekuivatatud tomatiga või puhul ei olnud antud meetodit võimalik rakendada.

Vastavalt standardile EVS-EN ISO 6887-5:2010 ja (Collins, Lyne 2004) tehti kõikidest võiplasma proovidest kümnendlahjenduste read ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ). Lahjendustel kasutati peptoonlahuseid, mis oli eelnevalt ettevalmistatud Eesti Maaülikooli toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia osakonna laborandi Kersti Veske poolt. Kersti Veske valmistas ette ka kõik töös kasutatavad steriilsed tardsöötmed.

Või maitselisandite puhul kaaluti 1 g maitseainet ettevalmistatud peptoonlahusesse (joonis 4) ning tehti analoogselt võiplasmaproovidele kümnendlahjenduste read kuni  $10^{-4}$ .



**Joonis 4.** Erinevate võitoodete maitselisandite proovide ettevalmistus mikrobioloogiliseks analüüsiks (rohelist värvi – karulauguga lisand, läbipaistev valge – soolakristallidega lisand ja punast värvi – päikesekuivatatud tomatiga lisand)

### 2.2.3. Mikrobioloogiline analüüs

Kogutud proovide mikrobioloogilisel analüüsil hinnati mikroobide, sh. hallitus- ja pärmseente üldarvu ja kolibakterite esinemist ning isoleeriti universaal- ja selektiivsöötmetel kasvanud morfoloogiliste tunnuste alusel eristuvad mikroobid (tabel 10). Mikrobioloogilises analüüsis kasutatud töövahendite ja mikroobide kasvusöötmete loetelu on toodud lisas 1.

**Tabel 10.** Koondtabel magistritöös teostatud analüüsides

Piimatööstus	Proovi nimetus	Partiide hulk	Meetodid	Mikrobioloogilised külvid/analüüsid**	Isolaadid
<b>T1</b>	Traditsiooniline või (TR1)	8	I-IV	Mikroobide üldarv,	20
	Soolakristallidega või (SK)	8	I-IV	Hallitus- ja pärmseened (lisaks R+gl),	12
	Päikesekuivatatud tomatiga või (PT)	8	II-IV	TSA (lisaks R+gl),	48
	Karulauguga või (KL)	5*	I-IV	coli-laadsed, MRS, M17 MALDI-TOF	16
	Soolakristallid	2	I	Mikroobide üldarv,	
	Päikesekuivatatud tomatiga lisand	2	I	Hallitus- ja pärmseened	
	Karulaugulisand	1	I		
<b>T2</b>	Traditsiooniline või (TR2)	8	I-IV	Mikroobide üldarv, Hallitus- ja pärmseened (lisaks R+gl), TSA (lisaks R+gl), coli-laadsed, MRS, M17	

*Märkused:* \* Karulauguga võid toodeti viiel korral, tulenevalt toote vähesest nõudlusest kaubanduses; \*\*Mikrobioloogilistes külvides kasutatud söötmete kirjeldused on toodud lisas 1 ja analüüsides kirjeldus alljärgnevalt meetodite kirjeldustes; I-IV – proovivõtmismeetodid võist; R+gl - võirasva ja glütserooli emulsioon mikroobide määramiseks

Morfoloogiliste tunnuste alusel (mikroobipesade kuju ja värvus söötmel ning mikroobide kuju ja värvumine Grami preparaadis) valiti 109st uuritud kolooniast välja 96 mikroobi, mis külvati puhaskultuuri saamiseks ümber uuele steriilsele söötmele. Isoleeritud mikroobide säilitamiseks pipeteeriti 1 ml glütserooli 1,5 ml Eppendorfi tuubi, kuhu lisati söötmetassilt külviaasaga (10 µm) mikroobide väljakasvu. Seejärel proov segati vorteksil ning viidi -20 °C juurde.

### 2.2.3.1. Mikroobide üldarvu määramine

Analüüsitava proovide kõikidest lahjendustest ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) pipeteeriti 1 ml uuritavat materjali paralleelselt kahele Petri tassile, millele valati peale steriilne 45 °C mikroobide kasvumeedium e. sööde. Seejärel segati proov ja sööde ettevaatlikult ja lasti tarduda. Mikroobide üldarvu määramisel kasutati agarsöödet Milk Plate Count Agar (LAB 115, LabM Ltd., Inglismaa) ning külvatud tassid inkubeeriti termostaadis 30 °C juures kuni 72 h. Hallitus- ja pärmseente üldarvu hindamisel kasutati Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (LAB 36, LabM Ltd., Inglismaa) agarsöödet, mille puhul külve inkubeeriti 25 °C juures 5 ööpäeva.

Tulemuste hindamisel valiti välja tassid, millel pesasid moodustavate ühikute (PMÜ) arv Petri tassil jäi antud töös vahemikku 10-300. Antud tassidele külvatud proovide lahjendusi arvesse võttes arvutati välja mikroorganismide sisaldus analüüsitavas tootes või lisandis, vastavalt PMÜ/ml või PMÜ/g.

Kokku teostati 336 külvi mikroobide üldarvu hindamiseks.

### 2.2.3.2. Mikroobide väjakasvu hindamine või rasvafaasist

Mikroobide väljakasvu hindamiseks rasvafaasist võeti proov esimese või teise (PT või puhul) meetodi (tabel 9) teel saadud tsentrifuugitud või rasvafaasist.

Või rasvafaasist mikroobide tuvastamisel võeti aluseks varem kirjeldatud meetodika, mida on kasutatud mikroobide määramiseks õlides ning kus rasva emulgeeriva aina kasutati glütserooli (Zhou 1998). Käesolevas töös modifitseeriti Zhou poolt kirjeldatud meetodit selliselt, et 10 ml glütseroolile lisati 0,5 ml destilleeritud vett ning 0,5 ml sulanud või rasvafaasi. Antud komponendid segati omavahel ühtlaseks emulsiooniks ja saadi 0,5% glütserooli proovilahus (R+gl).

Analüüsil kasutati mitteselekteerivat agarsöödet TSA ning hallitus- ja pärmseente tuvastamiseks mõeldud *Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base* agarsöödet (lisa 1). Proovid külvati tardunud söötmetele steriilse 10 µm külviaasaga ja inkubeeriti 30 °C juures 72 h ning hallitus- ja pärmseentele mõeldud söötmed 25 °C juures 5 ööpäeva. Kokku uuriti mikroobipesasid 149 tardsöötmetelt.

### **2.2.3.3. Kolilaadsete bakterite väljakasvu hindamine**

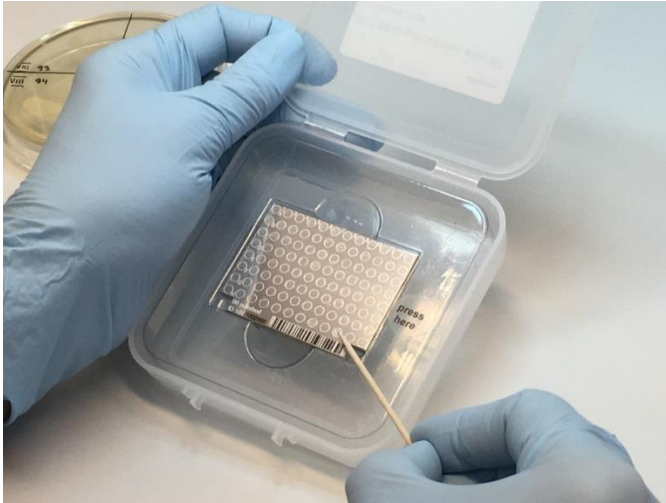
Kolilaadsete bakterite määramisel kasutati agarsöödet V.R.B.A Violet. Red. Bile. Agar (LAB 31, LabM Ltd., Inglismaa). Proov võeti 10 µm steriilse külviaasaga kõikide võiproovide (TR1, SK, PT, KL, TR2) ja lisandite esimesest lahjendusest ning teostati ühtlane pindkülv steriilsetele tardsöötmetele. Külve inkubeeriti termostaadis 30 °C juures kuni 24 h.

### **2.2.3.4. Mikroobide kasvatamine erisöötmetel**

Mikroobide kasvatamisel teostati ühtlane pindkülv 10 µm külviaasaga kõikide võiproovide (TR1, SK, PT, KL, TR2) ja lisandite esimese lahjenduse proovidest steriilsetele tardsöötmetele, mida seejärel inkubeeriti termostaadis 30 °C juures kuni 72 h. Väljakasvanud kolooniad loendati ja kirjeldati ning erinevate morfoloogiliste tunnustega mikroobikolooniatest tehti mikroskopeerimiseks Gram'i meetodil värvitud preparaadid. Mikroskoobi abil kirjeldati mikroobirakkude morfoloogilisi tunnuseid – Gram'i järgi värvumist, suurust, kuju ja asetust. Pärast mikroskopeerimist külvati mikroobikoloonia puhaskultuuri isoleerimiseks eraldi sama tüüpi steriilsele söötmele ja inkubeeriti 30 °C juures kuni 72 h. Antud tegevust korraldati kui MALDI-TOF analüüsini iga 15 päeva möödudes, säilitades söötmeid inkubeerimisjärgselt +6 °C juures.

### **2.2.3.5. Mikroobide identifitseerimine MALDI-TOF**

Mikroobide identifitseerimisel kasutati MALDI-TOF analüüsi meetodit. Esmalt kasvatati mikroobikolooniad 24 h 30 °C juures analüüsiks ette ning viidi Tartu ülikooli Biomeedikumi mikrobioloogia laborisse ning analüüsid teostati mikrobioloog-biokeemik Tiiu Rööp poolt. Analüüsiks võeti MALDI-TOF maatriks plaat (joonis 5), mille igasse maatrikspesasse pandi steriilse puutikuga mikroobikoloonia. Proovil lasti kuivada ning seejärel pipeteeriti igale proovile 1 µL 70% sipelghapet ning lasti sellel uuesti kuivada. Kõige lõpus pipeteeriti proovile veel 1 µL maatriksainet ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid).



**Joonis 5.** MALDI-TOF maatriksplaat koos katsematerjalidega

MALDI-TOF analüüs teostati Tartu Ülikooli kliinikumi mikrobioloogia laboris, kus maatriksplaat pandi analüsaatorisse ja määrati mikroobide liigiline kuuluvus. Tulemuste hindamisel võeti arvesse ka eelnevad uuringud, kus mikroobide isoleerimisel määrati mikroobi pesade morfoloogia ja mikroskopeerimisel saadud morfoloogilised kirjeldused.

#### **2.2.3.6. Küsitlus Eesti võitootjatele**

Magistritöö raames viidi läbi küsitlus, milles taheti teada kuidas hinnatakse ning millistest kvaliteedikriteeriumitest lähtutakse või mikrobioloogilist kvaliteeti erinevates võid toovates Eesti piimatööstusettevõtetes. Küsitlus vormistati google.docs formaadis (lisa 2) ning saadeti tööstuste kvaliteedijuhtidele e-posti kaudu. Eestis tegutseb üldse 6 suurt piimatööstust, kuid neist 4 toodavad võid, kes said ka valimisse palutud.

### **2.3. Andmete statistiline analüüs**

Andmete analüüsil kasutati andmetöötlusprogrammi MS Exceli 2013. Meetodite, või liikide ja partiide võrdlemiseks kasutati t-testi, kus statistiliselt oluliseks loeti p väärtus, mis jäi alla 0,05. Töös kasutatud andmed on esitatud tabelites ja illustreerivaks materjaliks on lisatud täiendavalt graafikud ja joonised.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. Mikroobide üldarv võiproovides

Magistritöö raames kogutud 37. võipartii proovides määratud mikroobide üldarvud on toodud tabelis 11.

**Tabel 11.** Mikroobide üldarv kahest Eesti piimatööstusest kogutud traditsioonilise ja lisanditega või proovides perioodil september 2016 – märts 2017

Või-tüüp	Meetod	Või partii (PMÜ/ml)								Keskmine log PMÜ/ml ± SD*
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	
TR1	I	875 000	100	490	150	1170	255	240	805	2,52 ± 0,36 <sup>A</sup>
	II	26 250	130	110	245	555	155	180	375	2,33 ± 0,24 <sup>A</sup>
	III	207 000	220	110	235	2185	225	205	0	2,46 ± 0,41 <sup>A</sup>
	IV	157 500	110	110	525	690	210	210	0	2,39 ± 0,31 <sup>A</sup>
SK	I	180	2100	100	205	690	350	0	200	2,65 ± 0,72 <sup>A</sup>
	II	225	0	110	255	695	535	145	120	2,37 ± 0,29 <sup>A</sup>
	III	130	0	110	110	700	790	0	120	2,34 ± 0,38 <sup>A</sup>
	IV	230	0	240	195	825	560	0	130	2,47 ± 0,28 <sup>A</sup>
PT	I	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	
	II	1165	2280	21650	5950	1675	6400	1805	3450	3,55 ± 0,39 <sup>A</sup>
	III	1475	2450	3900	1530	2230	12 800	1790	1860	3,4 ± 0,28 <sup>A</sup>
	IV	1170	1830	925	335	2385	1480	2025	2440	3,13 ± 0,27 <sup>A</sup>
KL	I	2650	2300	755	66 000	3700	-	-	-	3,62 ± 0,64 <sup>A</sup>
	II	10 250	1720	1040	14 000	1400	-	-	-	3,51 ± 0,47 <sup>A</sup>
	III	7400	1355	1015	22 400	935	-	-	-	3,47 ± 0,55 <sup>A</sup>
	IV	760	1420	740	194 000	915	-	-	-	3,43 ± 0,93 <sup>A</sup>
TR2	I	495	230	510	130	280	125	100	100	2,3 ± 0,27 <sup>A</sup>
	II	785	145	1270	140	485	100	130	110	2,39 ± 0,41 <sup>A</sup>
	III	540	215	565	120	445	100	0	0	2,42 ± 0,31 <sup>A</sup>
	IV	315	370	2180	130	0	135	0	100	2,44 ± 0,45 <sup>A</sup>

*Märkused.* \*Statistiline olulisus meetodite võrdlustes, <sup>A</sup>p>0,05; MT – mitte teostatav; TR1 – traditsioonilise või proov piimatööstusest „1“; SK – soolakristallidega või; PT – päikesekuivatatud tomatilisandiga või; KL – karulaugulisandiga või; TR2 – traditsioonilise või proov piimatööstusest nr. 2

TR1 esimese partii või analüüsi tulemused erinesid teadmata põhjustel teistest partiidest oluliselt. Töös kasutatud erinevate meetodite võrdluses tuvastati kõrgeim mikroobide üldarv antud partiis I meetodi puhul 10<sup>-4</sup> lahjendusest – 875 000 PMÜ/ml ning madalaim, 26 250



PMÜ/ml, II meetodi  $10^{-2}$  lahjendusproovist (tabel 12), ehk et erinevused antud partii üldarvudes on kahe erineva meetodi maksimaalse ja minimaalse tulemuse vahel ligikaudu 33 kordne.

**Tabel 12.** Mikroobide üldarv piimatööstus „1“ traditsioonilise või (TR1) esimeses partii

Meetod	Lahjendus	PMÜ/Petri tassil*			PMÜ/ml
		1	2	keskmine	
<b>I</b>	$10^{-1}$	>300	>300		
	$10^{-2}$	>300	>300		
	$10^{-3}$	300	285	292,5	<b>292500</b>
	$10^{-4}$	101	74	87,5	<b>875000</b>
<b>II</b>	$10^{-1}$	>300	>300		
	$10^{-2}$	250	275	262,5	<b>26250</b>
	$10^{-3}$	63	58	60,5	<b>60500</b>
	$10^{-4}$	6	10	8	80000
<b>III</b>	$10^{-1}$	>300	>300		
	$10^{-2}$	>300	>300		
	$10^{-3}$	205	209	207	<b>207000</b>
	$10^{-4}$	17	13	15	150000
<b>IV</b>	$10^{-1}$	>300	>300		
	$10^{-2}$	>300	>300		
	$10^{-3}$	157	158	157,5	<b>157500</b>
	$10^{-4}$	10	21	15,5	155000

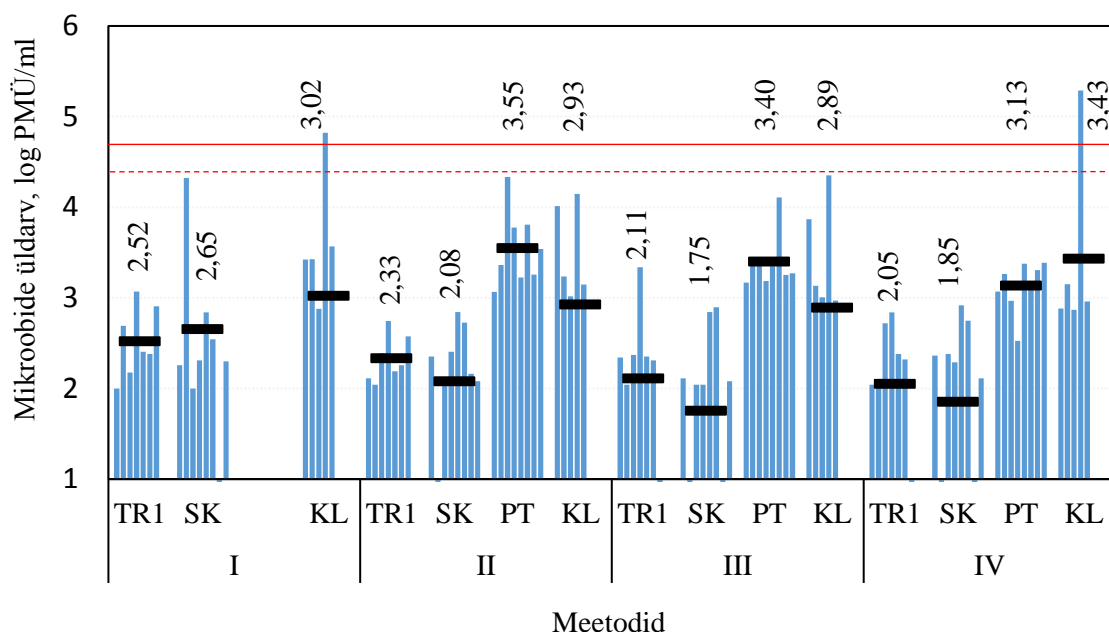
*Märkused:* \*Tabelis on esitatud kahe paralleelkatse (1 ja 2) ning nende keskmine pesasid moodustavate ühikute (PMÜ) arv

Huvitav on märkida, et tuginedes mikroobide üldarvu määramise standardmetoodikale, kus mikroobide pesasid moodustavad ühikud loetakse tassidelt, milles nende hulk jääb vahemikku 30 – 300 PMÜ/ml, annavad I ja II meetodi antud vahemikku sobivad võiproovide lahjendused suuremas lahjenduses (vastavalt  $10^{-4}$  ja  $10^{-3}$ ) 2 – 3 korda kõrgema mikroobide PMÜ hulga, kui kummagi meetodi 10 korda väiksem lahjendus (vastavalt  $10^{-3}$  ja  $10^{-2}$ ). Sellest tulenevalt tekib küsimus: kumba tulemust ja millist lahjendust arvestada hinnangu andmisel? Kas proovide kümnendlahjenduste arv kuni  $10^{-4}$  (tööstustes tavaliselt  $10^{-3}$ ) on piisav? Spekuleerime, et suure mikroobide üldarvuga proovide puhul takistab nii nende arvukus kui või rasvafaas mikroobipesade väljakasvu söötmel, mistõttu teostatav mikroobide üldarvu analüüs ei pruugi anda usaldusväärset vastust. Järgnevates analüüsides on TR1 esimese partii analüüsitulemused teistest partiidest selgelt eristuvate tulemuste tõttu välja jäetud.

Kõige suurem mikroobide üldarv leiti KL IV partii võiproovis IV meetodi korral - 194 000 log PMÜ/ml, samas kui nii TR1, TR2 kui SK proovide hulgas jäi mikroobide kasv kuni kolmes partiis 1-3 meetodi puhul tuvastamata.

TR1 võiproovides täheldati kõige suuremat mikroobide üldarvu I meetodi puhul – keskmiselt 2,52 log PMÜ/ml, millele järgnesid meetod II, III ja IV tulemused, vastavalt 2,33, 2,11 ja 2,05 log PMÜ/ml (joonis 6). Statistiliselt oluline erinevus meetodite vahel puudus ( $p>0,05$ ).

SK või puhul oli samuti kõige kõrgem mikroobide üldarv meetod I puhul, keskmiselt 2,65 log PMÜ/ml ning kõige madalam meetod III puhul – keskmiselt 1,75 log PMÜ/ml ( $p>0,05$ ). Ka PT võiproovides, mille puhul õnnestus kasutada vaid kolme meetodit (esimest meetodit ei saadud rakendada, kuna või plasmafaas oli liialt viskoosne, et seda süstlaga eemaldada), oli mikroobide üldarv madalaim IV meetodi korral – 3,13 log PMÜ/ml ( $p>0,05$ ).



**Joonis 6.** Mikroobide üldarv erinevat tüüpi või partiides nelja proovivõtmismeetodi (I-IV) korral. Igale partiile vastab joonisel oma tulp, keskmine mikroobide üldarv erinevat tüüpi võiis (TR1-traditsiooniline või piimatööstusest „1“, SK-soolakristallidega või, PT-päikesekuivatatud tomatilisandiga või, KL-karulaugulisandiga või) iga proovivõtmismeetodi puhul on esitatud musta horisontaaljoonega. Punane pidevjoon ja katkendlikjoon tähistavad tööstustes enim kasutatavaid piirnorme vastavalt 4,7 ja 4,4 log PMÜ/g (ehk 50 000 ja 25 000 PMÜ/g)

Kokkuvõttes võib öelda, et nii traditsioonilise, soolakristallide ja tomatilisandiga võiproovide puhul tuvastati kõige kõrgem mikroobide üldarv kasutades meetodit, mis sisaldas kõige

vähem rasvafaasi (meetod I ja II), ehkki statistiliselt oluline erinevus antud valimi puhul jäi rakendatud meetodite vahel tuvastamata ( $p > 0,05$ ). Võimalik, et suurema valimi korral oleks proovivõtmismeetodist tulenevad erinevused ka statistiliselt tuvastatavad. Kahjuks puuduvad ka kirjanduse andmed, mis selgitaksid proovi võtmisel kaasatud või rasvafaasi mõju mikroobide kasvule söötmel.

KL võiproovides oli mikroobide üldarv vastupidiselt teistele võidele kõige kõrgem meetod IV puhul – 3,43 log PMÜ/ml, millele järgnesid oma kahanevate tulemustega meetodid I, II ja III (keskmised vastavalt 3,02, 2,93 ja 2,89 log PMÜ/ml,  $p > 0,05$ ). Antud tulemust võib selgitada uuringus kasutatud võipartiide väiksem hulk (5) võrreldes teiste võitüüpidega (7-8 partiid). Võipartiide võrdluses täheldati mikroobide üldarvus kõikumisi, mis on seletatav või valmistamise lähteaine (koore) mikrobioloogilise kvaliteediga (Elias, P., Elias, A. 2004). Kirjanduse andmetel (Food Administration Manual 1995) on võis lubatud mikroobide üldarvu piirnormina sätestatud 25 000 PMÜ/g (4,4 log PMÜ/ml), samas kui Ledenbach ja Marshall (2009) andmetel võiks see olla poole suurem – 50 000 PMÜ/g (4,7 log PMÜ/g). Eestis puuduvad konkreetset mikrobioloogilised kriteeriumid (bakterite ning hallitus- ja pärmseente üldarv, jne.) või kvaliteedile ning iga ettevõtte kehtestab mikrobioloogilised kvaliteedinormid vastavalt toote kestvuskatsetel saadud tulemustest. Enesekontrolliplaani kohaselt, peab EU määruses 2073/2005 kehtestatud nõuete kohaselt tagama toidu ohutu tootmise (Toiduseadus § 22 lg 2).

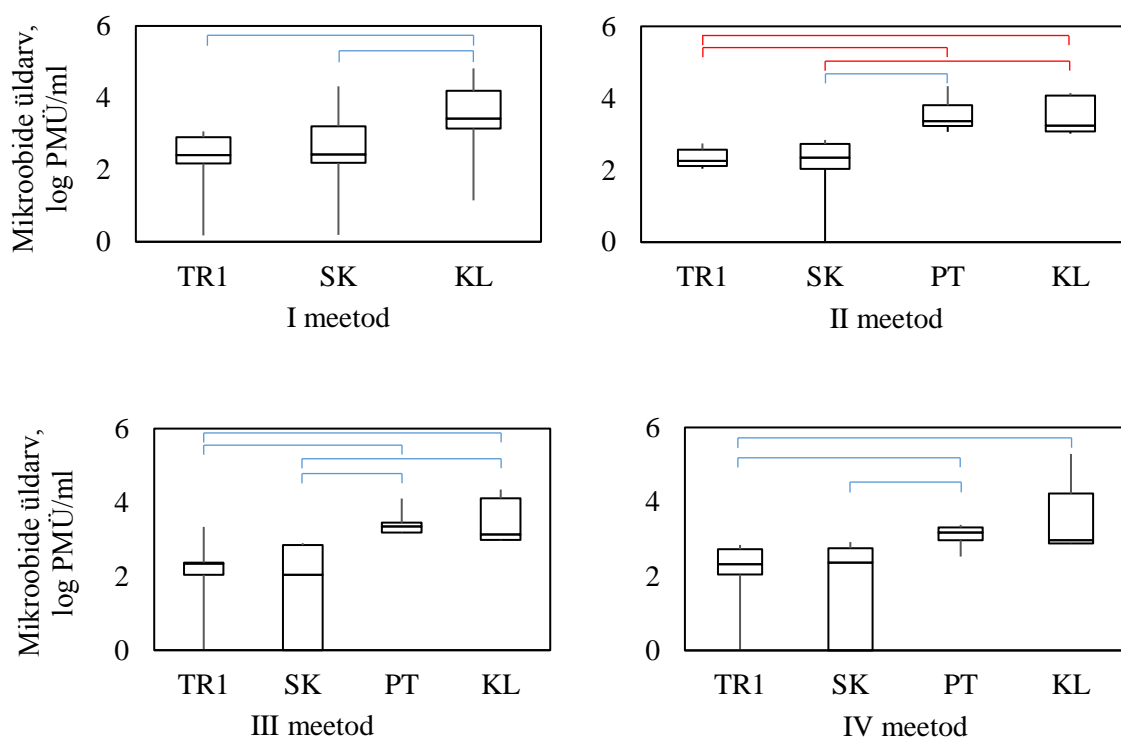
### **3.2. Mikroobide üldarv olenevalt võitüübist ja proovivõtmismeetodist**

Võrreldes mikroobide üldarvu tulemusi erinevat tüüpi või proovides nelja proovivõtmismeetodi korral, tuvastati omavahel sarnased ( $p > 0,05$ ) ja ühtlasi madalaimad väärtused kõigi meetodite puhul TR1 ja SK proovides (joonis 7). Statistiliselt sarnased tulemused mikroobide üldarvus andsid kõikide proovivõtmismeetodite puhul ka taimsete lisanditega ehk PT ja KL võiproovid ( $p > 0,05$ ).

Võrreldes meetod I puhul TR1, SK ja KL proovide tulemusi, leiti, et mikroobide üldarv on viimases nii TR1 kui SK andmetest oluliselt kõrgem ( $p < 0,05$ ). Ka meetodite II ja III võiproovide võrdluses täheldati taimsete maitselisanditega võide puhul oluliselt kõrgemat mikroobide üldarvu võrreldes TR1 ja SK proovidega ( $p < 0,05$  või lausa  $< 0,001$ ). Meetod IV

puhul tulemused eelnevatest kahest meetodist oluliselt ei erinenud – vaid SK ja KL võiproovide vahel jäi statistiliselt oluline erinevus tuvastamata  $p>0,05$ .

Saadud tulemuste alusel võib järeldada, et taimsete lisandite lisamine võis tõsta tootes mikroobide hulka, mis tõenäoliselt suurendab võimalust toote kiiremaks riknemiseks võrreldes traditsioonilise ja ka soolakristallidega võiga. Taimsete lisandite osa või sekundaarsel saastumisel on kirjeldanud ka Zhao kaasautoritega (2000), kes uurisid juhtumit, kus küüslauguvõi tarbimisel nakatuti *Campylobacter jejuni*'ga ning uurimistulemuste järeldusel leiti, et antud patogeen sattus võisse küüslauguga ristsaastumisel teel.



**Joonis 7.** Mikroobide üldarv erinevate võitütüüpide ja meetodite võrdluses (TR1-traditsioonilise või proov piimatööstusest „1“, SK-soolakristallidega või, KL-karulauguga või), kus punaste klambritega on näidatud  $p$ -väärtused  $<0,001$  ja siniste klambritega  $<0,05$

Soola kui toote maitseisandi inhibeerivat mõju mikroorganismidele on varem kirjeldatud mitmete autorite poolt (Poikalainen 2004; Fuquay *et al.* 2011), kes on maininud, et kõrge soola kontsentratsioon või plasmafaasis mõjutab vaba vee kättesaadavust mikroorganismide elutegevusele, mis sellest tulenevalt pärsib nende kasvu võis. Soola, kui võimaliku mikrobioloogilise saasteallika mõju erinevatele toiduainetele on samuti mitmete autorite poolt varem kirjeldatud (Poikalainen 2004; Kornacki *et al.* 2011). Käesolevas töös ei täheldatud ei

soola inhibeerivat ega ka kasvu soodustavat mõju mikroobidele, kuna mikroobide üldarv oli soola mittesisaldavas TR1 ja 1,5 g soola 100 g kohta võis sisaldavas SK proovides sarnane ( $p>0,05$ ).

Kirjanduses on vähe või puuduvad täiesti andmed eri tüüpi võide ja mikrobioloogilise kvaliteedi hindamismeetoditest tulenevate erinevuste kohta, mistõttu käesoleva töö tulemusi ei ole võimalik teiste autorite andmetega võrrelda.

### 3.2.1. Lisandite mikrobioloogiline kvaliteet

Antud töös traditsioonilisele võile lisaks uuritud võide puhul kasutati kolme erinevat lisandit: soolakristallide, päikesekuivatatud tomatiga ja karulauguga lisand. Lisandite analüüsil määrati kolilaadsed bakterid, mikroobide ning hallitus- ja pärmseente üldarv. Uuringusse kaasatud SK ja PT 1.-7. võipartiis kasutati soolakristallidega ja päikesekuivatatud tomatiga lisandite esimesi partiisid, samas kui 8. võipartiis võeti kasutusele uued lisandipartiid. KL kõikides võipartiides oli kasutusel vaid üks lisandipartii. Nimetatud lisanditest määratud mikroobide üldarvu tulemused on toodud tabelis 13.

**Tabel 13.** Mikroobide üldarv maitselisandites

Partii	Maitselisandid, PMÜ/g		
	Soolakristallid	Päikesekuivatatud tomatiga segu	Karulaugu segu
I	0	8400	1900
II	0	10 950	-

Selgus, et uuritud võipartiides kasutatud karulauguga lisandis oli mikroobide üldarv 1900 PMÜ/g, mis on ligikaudu 4-6 korda madalam võrreldes päikesekuivatatud tomatiga lisandi tulemustega, mis oli kõrgeim 8. võipartiis kasutatud II lisandipartiis 10 950 PMÜ/g. Kumbki lisand kolilaadseid baktereid ei sisaldanud. Sarnaselt varem kirjeldatule (Klebukowska *et al.* 2015), tuvastati ka antud töös kõikidelt taimsete lisandite proovide külvides *Bacillus* sp. pesasid.

Võis kasutatud soolakristallide partiide proovides mikroobe, sh. hallitus- ja pärmseeni ega ka kolibaktereid ei tuvastatud.

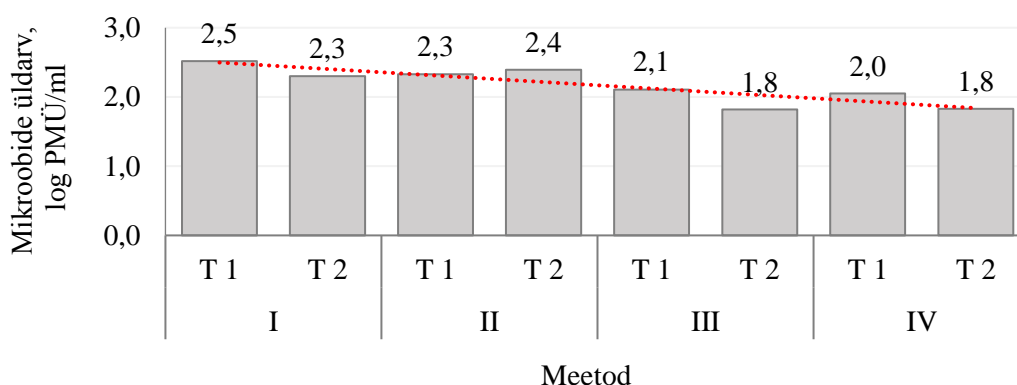
Varem kehtinud Eesti Vabariigi valitsuse määrus nr. 166 andmetel võib bakterite üldarv soolas olla  $10^3$ , maitseainetes, ürtides ja maitseainete segudes  $5 \cdot 10^7$  PMÜ/g ning kuivatatud

köögiljadel  $10^4$  PMÜ/g. Antud määrustest lähtudes järeldub, et uuritud päikesekuivatatud tomatiga lisandi II partiis peaks mikroobide hulk olema madalam, alla 10 000 PMÜ/g.

### 3.3. Mikroobide üldarv traditsiooniliste võide võrdluses

Käesolevas töös kahe piimatööstuse (T1 ja T2) traditsioonilise või (vastavalt TR1 ja TR2) partiiproovides leitud mikroobide üldarv jäi vahemikku 0 – 2185 PMÜ/ml (tabel 11). T1 ja T2 traditsioonilise või uuritud partiide mikroobide üldarvu keskmised väärtused, vastavalt 2,0 – 2,5 ja 1,8 – 2,4 log PMÜ/ml, olid omavahel sarnased ( $p>0,05$ ).

Selgitades rasvafaasi eraldamise mõju võiplasmas sisalduvate mikroobide üldarvu hindamisele, võrreldi mõlema piimatööstuse traditsioonilise või proove, kasutades erinevaid proovivõtmismeetodeid. Kõige kõrgem mikroobide keskmine üldarv T1 võiproovide võrdluses oli I meetodi puhul – 2,5 log PMÜ/ml, samas kui T2 proovide suurim mikroobide keskmine üldarv oli tuvastatav II meetodi puhul – 2,4 log PMÜ/ml (joonis 8).



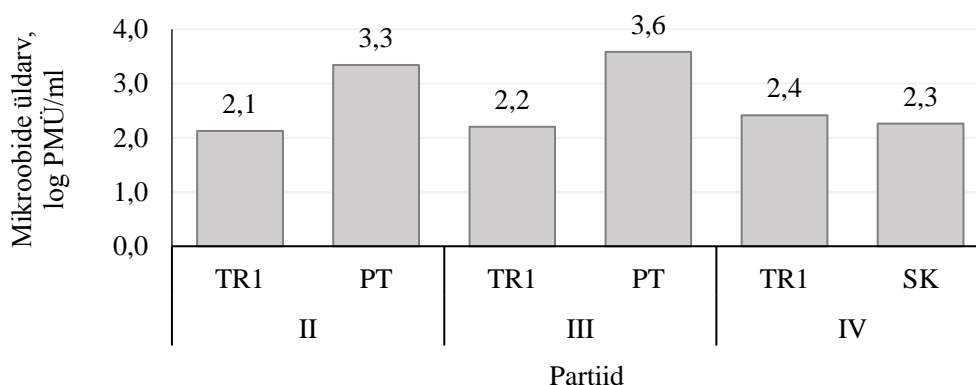
**Joonis 8.** Mikroobide keskmine üldarv erinevate meetodite (I-IV) võrdluses kahe piimatööstuse (T1 – piimatööstus „1“, T2 – piimatööstus „2“) traditsioonilises võis

Võrreldes omavahel mõlema tööstuse traditsioonilise või proove meetodite lõikes, statistiliselt olulist erinevust mikroobide üldarvus ei täheldatud ( $p>0,05$ ). Ometigi leiti negatiivne korrelatsioon ( $R^2 = 0,78$ ) mikroobide üldarvu ja proovivõtmismeetodi vahel võist ehk mida rohkem on testitavas võiproovis rasva (tulenevalt proovivõtmistehnikast, suureneb rakendatud meetodite puhul proovis rasvasisaldus tõenäoliselt suunas I-II-III-IV), seda väiksem on selles mikroobide üldarv.

### 3.4. Toorainepõhine võitüüpide võrdlus

Uuringus kasutatud võipartiide puhul oli traditsioonilise ja lisanditega või puhul sama tooraine ehk koor kasutusel kolmel korral (joonis 9) - teise ja kolmanda TR1 ja PT partii võidel ning neljanda partii TR1 ja SK või puhul. Teiste võipartiide puhul olid igas kasutusel erinevad koorepartiid.

Sama tooraine ehk koorepartiiga valmistatud või proove võrreldes leiti, et lisandiga PT võis on mikroobide üldarv suurem kui TR1 proovides. Näeme, et kolmandas partiis on TR1 proovis mikroobide üldarv kõrgem – 2,2 PMÜ/ml võrreldes teise partiiga (2,1 PMÜ/ml), mistõttu võib oletada, et sellest tulenevalt on ka PT kolmanda partii proovis mikroobide üldarv suurem (3,6 PMÜ/ml) kui teise partii puhul (3,3 PMÜ/ml). SK ja TR1 neljanda partii võiproovide võrdluses täheldati aga vastupidist tulemust, kui soolakristallide lisandiga või oli mikroobide üldarv madalam kui traditsioonilises võis (vastavalt 2,3 ja 2,4 PMÜ/ml).



**Joonis 9.** Ühise tooraine baasil võrreldud mikroobide üldarv (TR1 – traditsioonilise või proov piimatööstusest „1“, PT – päikesekuivatatud tomatiga või, SK – soolakristallidega või)

Taas võib järeldada, et taimsete lisandite lisamisel tekib oht toote sekundaarseks saastumiseks. Enne lisandite kasutamist tuleks määrata selle mikrobioloogiline kvaliteet ja vajadusel võtta kasutusele meetmed, mis aitavad mikrobioloogilised ohud võimalikult madalale langetada. Soola puhul võiks oletada, et sellel oli mikroobide kasvule inhibeeriv toime nagu seda on varem teiste autorite poolt kirjeldatud (Kornjacki *et al.* 2011), kuid kuna käesoleval juhul on tegu vaid ühe võrdluskatsega, tuleks taoliste järelduste kinnitamiseks teostada katseid suurema valimi peal.

### 3.5. Hallitus- ja pärmseente üldarv võiproovides

Hallitus- ja pärmseeni esines kõikide uuritud võiproovide hulgas vaid kuues partiiis (tabel 14). Sarnaselt bakterite üldarvu hindamistulemustele (tabel 11) eristusid ka hallitus- ja pärmseente analüüsitulemustes TR1 esimese võipartii üldarvud, mistõttu järgnevatest analüüsides on antud tulemusi mitte arvestatud.

Kõige enam, kolmest võipartiist võetud proovidest, tuvastati hallitus- ja pärmseente kasvu PT või puhul, kus sarnased tulemused leiti 4. võipartiis nii II kui IV meetodi korral – vastavalt 390 ja 180 PMÜ/ml, samas kui kuuendas ja seitsmendas partiiis tuvastati nimetatud mikroobide kasv kummaski vaid ühe meetodi korral – vastavalt IV meetodiga 21 000 PMÜ/ml ning II meetodiga 15 000 PMÜ/ml. Mis põhjusel jäi III meetodiga antud partiides hallitus- ja pärmseente esinemine tuvastamata, ei ole valimi väiksuse tõttu võimalik välja selgitada.

Kõige suurem hallitus- ja pärmseente üldarv leiti KL 2. partii võiproovis II proovivõtmismeetodi korral - 175 000 log PMÜ/ml, samas kui antud partii III ja IV meetodi teel võetud proovides oli see oluliselt madalam, jäädes alla lubatud piirnorme (<1000 PMÜ/g) (Vabar... nr 166) – vastavalt 670 ja 450 PMÜ/ml. Proovivõtmismeetod I puhul nimetatud partiis hallitus- ja pärmseente esinemist ei täheldatud. Kuna teistes KL partiides hallitus- ja pärmseeni ei tuvastatud, ei ole valimi väiksuse tõttu võimalik järeldada, kas tegu võis olla juhusliku saastumisega võiproovi võtmisel või oli toode juba eelnevalt tootmis- või transpordiprotsessis saastunud.

Proovivõtmismeetod II abil tuvastati hallitus- ja pärmseente esinemine ka SK esimeses partiiis 435 PMÜ/ml ja TR1 2. partiiis – 120 PMÜ/ml. T2 tööstuse võiproovides jäi hallitus- ja pärmseente kasv tuvastamata.



**Tabel 14.** Hallitus- ja pärmseente üldarv kahest Eesti piimatööstusest kogutud traditsioonilise ja lisanditega või proovides perioodil september 2016 – märts 2017

Võitüüp	Meetod	Või partii (PMÜ/ml)							
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
TR1	I	30 000	0	0	0	0	0	0	0
	II	18 250	0	120	0	0	0	0	0
	III	18 600	0	0	0	0	0	0	0
	IV	16 900	0	0	0	0	0	0	0
SK	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	435	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0
PT	I	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT
	II	0	0	0	390	0	0	15 000	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV	0	0	0	180	0	21 000	0	0
KL	I	0	0	0	0	0	-	-	-
	II	0	175 000	0	0	0	-	-	-
	III	0	670	0	0	0	-	-	-
	IV	0	450	0	0	0	-	-	-
TR2	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0

*Märkused:* MT – mitte teostatav; TR1 – traditsioonilise või proov piimatööstusest „1“; SK – soolakristallidega või; PT – päikesekuivatatud tomatilisandiga või; KL – karulaugulisandiga või; TR2 – traditsioonilise või proov piimatööstusest „2“

Huvitav on märkida, et mitte ühegi võitüübi ja -partii puhul ei olnud I proovivõtmismeetodi puhul hallitus- ja pärmseeni võimalik tuvastada, mistõttu võib oletada, et hallitus- ja pärmseened jäävad võiproovi tsentrifuugimisel rasvafaasiga seotuks.

Arvestades, et uuritud 136. proovist vaid 9 (7%) sisaldasid hallitus- ja pärmseeni, millest enamuse (6/9, 67%) jäid alla lubatud piirnormi (<1000 PMÜ/g) (Vabar... nr 166), võime täheldada head sanitaar-hügieenilist olukorda nii T1 kui T2 tööstuses. Hallitus- ja pärmseente madalat esinemist (<1000 PMÜ/g) ühe Eesti võitootja võis on eelnevalt näidanud ka Vau (2005) oma magistritöös kus ta uuris või mikrobioloogilist kvaliteeti. Asjaolu, et käesolevas töös tuvastati hallitus- ja pärmseente esinemine üle lubatud piirnormide vaid PT ja KL võiproovides, viitab taimsete maitselisandite lisamisel tekkivale ristsaastumisohule toodetes.

### 3.6. Mikroorganismide isoleerimine ja samastamine

Mikroobide väljakasvatamiseks ja puhaskultuuride isoleerimiseks T1 erinevate võitüüpide plasma- ja rasvafaasist kasutati söötmeid, mille kirjeldused on toodud lisas 1. Erinevatel kasvumeediumitel välja kasvanud mikroobipesad loendati ja saadud tulemused on esitatud tabelis 15. Lisaks loendamisele kirjeldati mikroobipesade morfoloogiat ning antud tunnuste alusel eristuvad kolooniad mikroskopeeriti ja hinnati rakkude Gram'i järgi värvumist, kuju, suurust ja asetust.

Antud töös isoleeriti ja mikroskopeeriti nii eri tüüpi võiproovide plasma- ja rasvafaasidest kokku 109 mikroobikolooniat, mille seast valiti erinevate morfoloogiliste tunnuste alusel välja 96 isolaati MALDI-TOF analüüsiks. Kõige enam oli antud valimis PT plasma- ja rasvafaasidest isoleeritud kultuure, vastavalt 36 ja 12, kus kummagi puhul identifitseeriti pooled (18 ja 6) isolaatidest. TR1 proovide isolaate oli vastavalt 14 ja 6 (tuvastati neist 6 ja 2), KL puhul 13 plasmast ja rasvast 3 (tuvastati 6 ja 1) ning SK proovidest mõlemast võifaasist 6, millest tuvastati vastavalt 4 ja 2 liiki. Kokku suudeti MALDI-TOF analüsaatoriga samastada vaid 45 ehk 47% isolaatidest, mille moodustasid 22 bakteriliiki ja kolme isolaadi puhul liigid perekondadest *Bacillus* ja *Lactobacillus*, kelle täpne liigiline kuuluvus jäi tuvastamata (tabel 16).

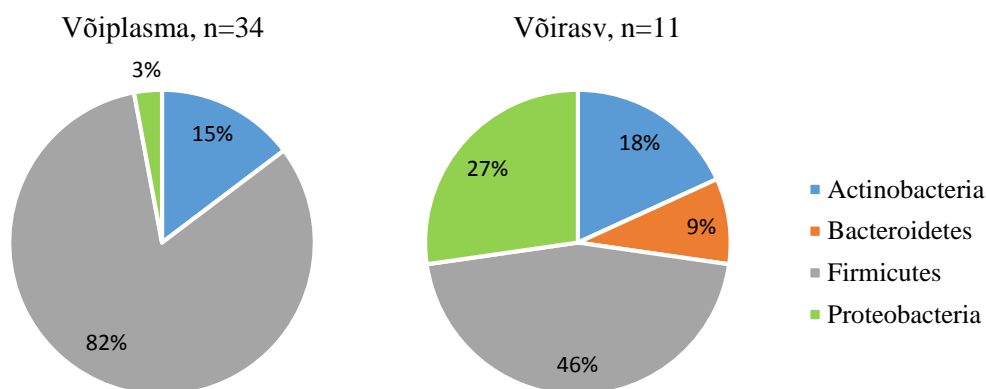
Tuvastatud bakteritest enim, 28/34 (82%) võiplasma ja 5/11 (46%) võirasva isolaatidest, kuulusid hõimkonda Firmicutes, kes olid rasvafaasis esindatud perekondadega *Bacillus* ja *Staphylococcus* ning plasmafaasis lisaks veel perekond *Lactobacillus* nelja liigiga (*L. plantarum*, *L. ruminis*, *L. salivarius* ja *Lactobacillus* sp.) (joonis 10). Kummagi võifaasi proovides esines veel baktereid hõimkondadest Actinobacteria ja Proteobacteria (plasmas vastavalt 5/34 ja 1/34 ning rasvas 2/11 ja 3/11).

**Tabel 15.** Erinevate võitüüpide partiiproovidest väljakasvanud mikroobikultuurid

Partii	Võitüüp	Mikroobide kasvumeedium (pesade arv Petri tassil)					
		M17	MRS	TSA	TSA (R+gl)	Coli	H+P (R+gl)
<b>I</b>	<b>TR1</b>	1	2	L	7	2	0
	<b>SK</b>	1	0	0	1	0	0
	<b>PT</b>	0	1	2	4	0	0
	<b>KL</b>	1	0	4	3	0	0
<b>II</b>	<b>TR1</b>	0	0	0	L	0	0
	<b>SK</b>	0	0	0	3	0	0
	<b>PT</b>	3	2	3	L	0	0
	<b>KL</b>	0	7	36	20	0	22
<b>III</b>	<b>TR1</b>	0	0	2	L	0	0
	<b>SK</b>	1	0	6	0	0	0
	<b>PT</b>	1	2	6	L	0	0
	<b>KL</b>	2	0	4	0	0	1
<b>IV</b>	<b>TR1</b>	0	0	6	13	0	4
	<b>SK</b>	0	0	0	37	0	4
	<b>PT</b>	1	0	2	29	0	0
	<b>KL</b>	80	55	54	396	0	0
<b>V</b>	<b>TR1</b>	0	0	4	10	3	0
	<b>SK</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>PT</b>	3	4	3	2	0	0
	<b>KL</b>	0	0	0	0	0	0
<b>VI</b>	<b>TR1</b>	0	0	0	3	0	0
	<b>SK</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>PT</b>	13	16	22	0	0	0
	<b>KL</b>	-	-	-	-	-	-
<b>VII</b>	<b>TR1</b>	0	0	0	0	0	5
	<b>SK</b>	13	0	0	1	0	1
	<b>PT</b>	L	2	1	1	0	0
	<b>KL</b>	-	-	-	-	-	-
<b>VIII</b>	<b>TR1</b>	16	0	2	11	0	0
	<b>SK</b>	0	0	42	0	0	0
	<b>PT</b>	3	1	L	4	0	0
	<b>KL</b>	-	-	-	-	-	-

*Märkused:* R+gl – või rasvaprov glütserooliga; L – loendamatu (laadunud kasv); TR1 – traditsioonilise või provi piimatööstusest „1“; SK – soolakristallidega või; PT – päikesekuivatatud tomatilisandiga või; KL – karulaugulisandiga või

Lisaks kuulus üks rasvafaasi isolaat, *Elizabethkingia miricola*, hõimkonda Bacteroidetes, olles identifitseeritud liikide seas üks kahest tõelisest patogeenist lisaks KL plasmafaasiproovist tuvastatud Actinobacteria hõimkonda kuuluvale *Rhodococcus erythropolis* isolaadile (Green *et al* 2008; Baba *et al* 2009).



**Joonis 10.** MALDI-TOF analüüsil identifitseeritud mikroobide hõimkonnad uuritud võiproovide plasma- ja rasvafaasis

Kõige enam esines erinevaid liike PT plasma- ja rasvafaasi proovides – vastavalt 9 ja 6, kellest enamus liike plasmafaasis kuulusid perekonda *Bacillus* (*B. atrophaeus*, *B. firmus*, *B. oleronius*, *B. pumilus*, *B. subtilis* ja *Bacillus* sp.). Bakteripesade morfoloogilise kirjelduse alusel tuvastati *Bacillus* sp. kasvu kõikidel taimsete lisanditega võiproovide bakterite üldarvu külvitassidel ja ka vastavate võitüüpide maitselisandite analüüsi proovides.

Kõikidest või rasvafaasiproovideist isoleeritud liikidest 3/9 (33%) kuulusid perekonda *Bacillus*. *Bacillus* sp. jäi tuvastamata vaid KL rasvafaasi proovis. Huvitaval kombel leiti kolme võitüübi TR1, SK ja PT, puhul vaid rasvafaasiproovideist hõimkonda Proteobacteria kuuluv *Brevundimonas aurantiaca*, mida on hetkel veel vähe uuritud kuid mida tavaliselt leitakse mulla ja merevee proovidest (Pham *et al.* 2016; Abraham *et al.* 1999). Tõenäoliselt kuulus antud bakter või tootmisel kasutatud toorpiima mikrobiootasse, sattudes sinna loomasöödast.

**Tabel 16.** Võiproovidest tuvastatud mikroobi isolaadid

Või- tüüp	Mikroorganism				Isolaadid, n*	
	Hõimkond	Sugukond	Perekond	Liik	Plasmast	Rasvast
TR1	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	1**	
	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. clausii</i>	1	
				<i>B. pumilus</i>		1
		Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. salivarius</i>	1	
		Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	1	
				<i>S. hominis</i>	1	
	Proteobacteria	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	<i>B. aurantiaca</i>		1
		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. brenneri</i>	1**	
SK	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	1	
	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. firmus</i>	1	
				<i>B. subtilis</i>		1
				<i>B. vireti</i>	1	
		Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	1	
	Proteobacteria	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	<i>B. aurantiaca</i>		1
PT	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>K. marina</i>	1	
			<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>		1
		Streptomyetaceae	<i>Streptomyces</i>	<i>S. badius</i>	1	
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Elizabethkingia</i>	<i>E. miricola</i>		1
	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. atrophaeus</i>	1	
				<i>B. firmus</i>		1
				<i>B. oleronius</i>	1	
				<i>B. pumilus</i>	6	
				<i>Bacillus</i> sp.	2	
				<i>B. subtilis</i>	4	
		Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. ruminis</i>	1	
		Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>		1
				<i>S. warneri</i>	1	1
	Proteobacteria	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	<i>B. aurantiaca</i>		1
KL	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	<i>M. laevaniformans</i>		1
		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. erythropolis</i>	1	
	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. firmus</i>	2	
				<i>B. pumilus</i>	1	
		Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	1	
		Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	1	

Märkused. \*n – isolaatide arv võiproovide plasma- või rasvafaasist; \*\*TR1 esimesest, teistest analüüsist välja jäetud, partiist; TR1 – traditsioonilise või proov piimatööstusest „1“; SK – soolakristallidega või; PT – päikese kuivatatud tomatiliseandiga või; KL – karulaugulisandiga või

Asjaolu, et üle poole isolaatidest jäid identifitseerimata, tulenes tõenäoliselt sellest, et antud MALDI-TOF analüsaator, olles kasutusel TÜ Kliinikumi ühendlaboris, on optimeeritud tuvastama kliiniliselt olulisi ja enam esinevaid, sh. patogeenseid bakteriliike ning mille

andmebaas ei hõlma toidu ja keskkonnaga seotud liike. Sellest võib järeldada, et uuritud võiproovides esinesid eelkõige toorpiima või tööstuskeskkonna, sh. tooteid käitleva personali, loomulikke mikrobiotasse kuuluvad mittepatoogeensed (või üksikud tinglikult patogeensed) bakterid.

### 3.7. Eesti võitootjatele tehtud küsitluse tulemused

Küsitlusest võttis osa 4 Eestis tegelevat võid tootvat piimandusettevõtet. Ettevõtetele esitatud küsimustik on toodud lisas 2.

Küsitlusest selgus, et kõik uuringus osalenud Eesti piimatööstused kasutavad mikrobioloogiliste analüüside teostamisel standardeid EVS-EN ISO 4833-1:2013 ning EVS-EN ISO 4832:2010. Antud standardid on kasutuses nii pastöriseeritud piima kui ka koore mikrobioloogilistel kvaliteedi hindamisel. Või mikrobioloogilisel analüüsil kasutatakse lisaks nimetatutele veel EVS-EN ISO 6611:2013, EVS - EN ISO 6887-5:2010 standardeid ja kolilaadsete bakterite tuvastamiseks standardit NMKL 44(6):2004.

Eestis tegelevatest küsitletud suurettevõtetest 2 (50%) toodab ka eksportvõid ning antud toodetele on või kvaliteedikriteeriumid kehtestatud eksportmaa poolt (tabel 17).

Eestis on küsitletud võitootjad kehtestanud ettevõttesiseselt mikroobide üldarvu piirmääraks rõösakoorevõis aga lausa <10 000 PMÜ/g või isegi <5000 PMÜ/g, mis jääb eksportmaade poolt sätestatud nõuetest 5-10 korda madalamaks.

**Tabel 17.** Küsitletud Eesti ettevõtetes kasutatavad mikrobioloogilised nõuded eksportvõile

Uuritav näitaja	Pesa moodustavat ühikut (PMÜ)
Bakterite üldarv	<50 000
<i>E. coli</i>	<10/g
Hallitused- ja pärmseened	<10...<100/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	neg/25g
<i>Salmonella</i> sp.	neg/25g
Koagulaaspositiivsed stafülokokid	neg/g

Või kvaliteedi suhtes on vaid üks küsitletud ettevõtte täheldanud muutusi või säilivusaja osas, kus mikroobide üldarv suureneb vähesel määral ehk 70-200 PMÜ võrra (g kohta) temperatuuri 10 °C juures säilitamisel 90 päeva. Käesolevas magistritöös kahjuks või säilivustingimusi ja sellest lähtuvaid muutusi või mikrobioloogilise kvaliteedi osas ei uuritud.

## KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

Magistritöös uuriti või mikrobioloogilise kvaliteedi hindamismeetodeid nelja erineva võitüübi (traditsiooniline, soolakristallidega, päikesekuivatatud tomati- ja karlaugulisandiga või) puhul. Töös rakendati kolme rahvusvaheliselt kasutuses olevat proovivõtmise standardmetoodikat ning ühte *in-house* meetodit, mis erines või plasma- ja rasvafaasi selgema eristumise osas.

Kirjanduses on vähe või puuduvad täiesti andmed erinevate võitüüpide ja või mikrobioloogilise kvaliteedi hindamismeetoditest tulenevate erinevuste kohta. Teadaolevalt on antud töö esimene, mis püüab selgitada või plasma- ja rasvafaasi segunemise mõju või mikrobioloogilise kvaliteedi hindamisele. Kogutud andmete analüüsi tulemusel leiti:

1. Mikroobide üldarv traditsioonilises ja soolakristallidega võis on sarnane ( $p > 0,05$ ), jäädes vahemikku 2,05 – 2,65 log PMÜ/ml, samas kui päikesekuivatatud tomatiga ja karlaugu lisandiga võis on see võrreldes eelmistega oluliselt kõrgem (2,89 – 3,55 log PMÜ/ml,  $p < 0,05$ ). Hallitus- ja pärmseeni esines kõikide uuritud võiproovide hulgas vaid kuues partiis (7% proovides), millest enamus tulemusi (67%) jäid alla varem riiklikult kehtestatud lubatud piirnormide, <1000 PMÜ/ml.

Erinevat tüüpi või plasma- ja rasvafaasiproovidest isoleeriti magistritöö raames kokku 109 mikroobikolooniat, kelle hulgast valiti morfoloogiliste tunnuste alusel välja 96 isolaati MALDI-TOF analüüsiks, millega samastati vaid 47% isolaatidest, sh. 22 erinevat bakteriliiki. Kuna antud MALDI-TOF analüsaator, olles kasutusel TÜ Kliinikumi ühendlaboris, on optimeeritud tuvastama kliinilisi, sh. patogeenseid bakteriliike, võib järeldada, et uuritud võiproovides esinesid eelkõige toorpiima või tööstuskeskkonna, sh. tooteid käitleva personali, loomulikku mikrobiootasse kuuluvad mittepatoogeensed (või üksikud tinglikult patogeensed) bakterid, mida analüsaatori andmebaas ei ole seadistatud tuvastama.

2. Töös rakendatud meetodite puhul tulevad esile erinevused mikroobide üldarvus tulenevalt või plasma- ja rasvafaasi segunemisest proovi võtmisel, kus proovivõtmismeetodi ja mikroobide üldarvu vahel leiti negatiivne korrelatsioon ( $R^2 = 0,7876$ ) ehk mida enam on testitavas võiproovis rasva, seda väiksem on selles mikroobide üldarv. Statistiliselt oluline

erinevus meetodite võrdluses jäi tõenäoliselt liiga väikese valimi tõttu tuvastamata ( $p > 0,05$ ).

3. Mikroobide hulk on suurem taimseid lisandeid sisaldavates võiproovides võrdluses traditsioonilise ja soolakristallidega võiga. Seega tekib taimsete lisandite lisamisel oht või sekundaarseks saastumiseks, mida kinnitab ka taimset päritolu maitseainete mikrobioloogilisel analüüsil tuvastatud kõrge mikroobide üldarv (1900 – 10 950 PMÜ/g). Soola inhibeerivat ega ka kasvu soodustavat mõju mikroobide kasvule ei täheldatud. Tulemustest järeldub, et lisandite kasutamisel võis tuleks uurida lisandi mikrobioloogilist kvaliteeti ja võtta kasutusele ennetavad meetmed mikroobide üldarvu vähendamiseks lisandites.
4. Küsitluses osalenud Eestis tegutsevatest suurettevõtetest kasutavad mikroobide, sh. hallitus- ja pärmseente, üldarvu määramisel samu kehtivaid ja/või varem kehtinud standardeid piima ja piimatoodete mikrobioloogilisteks analüüsideks. Või mikrobioloogilisel hindamisel on igal piimatööstusel kehtestatud ettevõttesisesed kvaliteedikriteeriumid võile, kus mikroobide üldarv jääb vahemikku 5000 – 50 000 PMÜ/ml.

Kokkuvõtteks võib öelda, et või mikrobioloogiline kvaliteet Eestis on väga hea, kuid tugevamate seoste leidmiseks mikrobioloogilise kvaliteedi hindamismeetodite ja erinevate võitüüpide vahel peaks uuritavat valimit oluliselt suurendama, hõlmates erinevatest aastaaegadest tulenevaid kõikumisi toorpiimas ja sealt tulenevalt või mikrobiootas.

Magistritöö teostamisel tekkinud mõtted teema edasiuurimiseks:

- Uurida maitselisanditega või mikrobioloogilist kvaliteeti nende säilivusaja vältel, saamaks teada, kas lisandites sisalduvad antimikroobiaalsed ühendid inhibeerivad mikroobide kasvu või pikemal säilivusel.
- Uurida sempoonselt või rasvhappelise koostise ja mikroobide üldarvu vahelist seost.
- Uurida mikroobide üldarvu erineva rasvasisaldustega lisanditeta ja lisandiga võis.



## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abiks põllumajandussaaduste väikekäitlejale (2012) II osa. Piim ja piima töötlemine. Koostaja MTÜ Eesti Toiduainete Tehnoloogia Selts – Põllumajandusministeerium, 249 lk.
- Abraham, W-R., Strömpl, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, B. R. E., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindali, B. J., Bennasar, A., Smit, J., Tesar, M.** (1999). Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundirnonas* and *Caulobacter*. – *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 49, pp. 1053-1 073.
- Adler, B. B., Beuchat, L. R.** (1999). Death of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in Garlic Butter as Affected by Storage Temperature. – *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 12, pp 1976–1980.
- Ahmed, S. S. J., Abdalla, M. O. M., Rahamtalla, S.A.** (2015). Microbiological Quality of Cows' Milk Butter Processed in Khartoum State, Sudan — *British Microbiology Research Journal*. Vol. 11, No. 1, pp. 1-10.
- AL-Oqaili, R. M., Istabreq, B. B. M., Salman, M. A., Al-Satar, D. A.** (2014). In Vitro Antibacterial Activity of *Solanum Lycopersicum* Extract against some Pathogenic Bacteria – *Food Science and Quality Management*. Vol. 27, pp. 12-18.
- Azizoglu, R. O., Kathariou, S.** (2010). Temperature-Dependent Requirement for Catalase in Aerobic Growth of *Listeria monocytogenes* F2365. – *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 76, No. 21, pp. 6998–7003.
- Baba, H., Nada, T., Ohkusu, K., Ezaki, T., Hasegawa, Y., Peterson, L. D.** (2009). First Case of Bloodstream Infection Caused by *Rhodococcus erythropolis* – *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 9. No, 8, pp. 2667-2669.
- Bagiu, R. V., Vlaicu, B., Butnariu, M.** (2012). Chemical Composition and in Vitro Antifungal Activity Screening of the *Allium Lysinum* L. (Liliaceae). – *International Journal of Molecular Science*. Vol. 13, No. 2, pp. 1426–1436.
- Bizzini, A., Greub, G.** (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. – *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 16, pp. 1614–1619.

- Blaško, J., Kubinec, R., Górová, R., Fábry, I., Lorenz, W., Ladislav, S.** (2010). Fatty acid composition of summer and winter cows' milk and butter. – *Journal of Food and Nutrition Research*. Vol. 49, No. 4, pp. 169–177.
- Budhkar, Y. A., Bankar, S. B., Singhal, R. S.** (2014). Milk and Milk Products: Microbiology of Cream and Butter. *Encyclopedia of Food Microbiology*/ Editor: Singhal, R. S., Kulkarni, P. R., Elsevier Ltd, Academic Press. Vol. 2, pp. 728–737.
- Bylund, G.** (1995). Dairy Processing Handbook. – Tetra Pak Processing Systems AB. 427 pp.
- Carolis, De E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Posteraro, B., Sanguinetti, M.** (2014). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology – *The Journal of Infection in Developing Countries*. Vol. 8, No. 9, pp. 1081-1088.
- Coliform bacteria. Determination in foods and feeds
- Collins, C. H., Lyne, P. M.** (2004) Microbiological Methods. Eight edition. London: Publisher by Arnold. 466 pp.
- Correia, A. F. K., Loro, C., Zanatta, S., Sopo, M. H. F., Vieira, T. M. F. S.** (2015). Effect of Temperature, Time, and Material Thickness on the Dehydration Process of Tomato. – *International Journal of Food Science*. Academic Editor: Elad Tako. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745559/> (05.03.2017)
- Edwards, J. L., Kennedy, R. T.** (2005). Metabolomic Analysis of Eukaryotic Tissue and Prokaryotes Using Negative Mode MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry – *Analytical Chemistry*. Vol. 77, No. 7, pp. 2201-2209.
- EL määrus nr 1308/2013. Rakenduseeskirjad seoses põllumajandustoodete kokkuostu ja müügi riikliku sekkumise puhul. EUROOPA PARLAMENDI JA NÕUKOGU MÄÄRUS (EL) nr 1308/2013, 17. detsember 2013, millega kehtestatakse põllumajandustoodete ühine turukorraldus ning millega tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrused (EMÜ) nr 922/72, (EMÜ) nr 234/79, (EÜ) nr 1037/2001 ja (EÜ) nr 1234/2007 EL nr 1308/2013, <http://eurlex.europa.eu/legal-content/et/TXT/?uri=CELEX3A32013R1308> (07.04.2017)
- EL määrus nr 853/2004. Loomset päritolu toidu hügieeni erieeskirjad. (29. aprilli 2004. (EÜ) nr 853/2004) <http://eur-lex.europa.eu> (12.12.2016)
- Elias, P., Elias, A.** (2004). Piima ja piimatoodete mikrobioloogia. EPMÜ Loomaarstiteaduskond, toiduteaduse osakond, Kirjastus Halo, Tartu, 195 lk.
- Elkhidir, D. A.** (2003). Microbiological evaluation of marketed butter in Khartoum Governorate. Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Public and Environmental Health University of Khartoum. 83 pp.
- EVS-EN ISO 4832:2010 – Toidu ja loomasöötade mikrobioloogia. Horisontaalmeetod coli-laadsete arvuliseks määramiseks. Kolooniate loendamise meetod (ISO 4832:2006)

- EVS-EN ISO 6611:2011 – PIIM JA PIIMATOOTED Pärmide ja/või hallituste kolooniaid moodustavate ühikute arvuline määramine. Kolooniate loendamise meetod temperatuuril 25 °C (ISO 6611:2004)
- EVS-EN ISO 6887-5:2010 – Toidu ja loomasöödade mikrobioloogia. Katseproovide, algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste valmistamine mikrobioloogiliseks uuringuks. Osa 5: Erieeskirjad piima ja piimatoodete ettevalmistamiseks.
- EVS-EN ISO 707:2008 – Piim ja piimatooted. Proovivõtjuhend
- EVS-EN ISO4833-1:2013 – Toiduahela mikrobioloogia. Mikroorganismide loendamise horisontaalne meetod. Osa 1: Kolooniate loendamine sügavkülvi tehnikat kasutades temperatuuril 30 °C.
- EÜ määrus nr 2073/2005. Komisjoni määrus (EÜ) nr 2073/2005, 15. november 2005, toiduainete mikrobioloogiliste kriteeriumide kohta. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20170101&qid=1491678015824&from=ET> (10.05.2016)
- FAO Food and Agriculture Organization (2007). Milk and Milk Products, First Edition pp.242 [https://www.fao.org/codex/Publications/Booklets/Milk/Milk\\_2007\\_EN.pdf](https://www.fao.org/codex/Publications/Booklets/Milk/Milk_2007_EN.pdf) (27.11.2016)
- FDA Food and Drug Administration (2001). Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods — Chapter 4. Analysis of Microbial Hazards Related to Time/Temperature Control of Foods for Safety. [e-artikkel] <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094147.htm> (22.02.2017)
- Fernandes, R.** (2009). Butter and dairy spreads. – *Microbiology Handbook*. UK: Leatherhead. pp. 167
- FSD Food Safety Database. (2000). Recommended Storage Times and Temperatures for Milk and Other Milk Products National Dairy Council. <http://www.fbd.org/wp-content/uploads/2011/06/Dairy-food-storage.pdf> (29.02.2017)
- Fuquay, J. W., Fox P. F., Mcsweeney, P. I. H.** (2011) Encyclopedia of Dairy Sciences. Second edition USA: Elsevier Ltd. 1009 pp.
- George, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rokc, E., Caris-Veyrat, C.** (2011). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamiin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. – *Food Chemistry*. Vol. 124, pp. 1603- 1611.
- Goff, H. D.** (2017) Butter Manufacture. - *The Dairy Science and Technology* [eBook] <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/butter-manufacture> (27.02.2017)
- Green, O., Murray, P., Gea-Banacloche, J. C.** (2008) Sepsis caused by *Elizabethkingia miricola* successfully treated with tigecycline and levofloxacin. – *Diagnostic microbiology and infectious disease*. Vol. 62, No.4, pp. 430-432.
- Hartigan-Go, K. Y.** (2013). Revised Guidelines for the Assesment of Microbiological Quality of Processed Foods. – *Food and Drug Administration*. 11 pp.

- Herbs and Spices. - *Encyclopedia of Food and Culture*. <http://www.encyclopedia.com/plants-and-animals/botany/botany-general/herbs-and-spices> (10.04.2017)
- Holliday, S. L., Adler, B. B., Beuchat, L. R.** (2003). Viability of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in butter, yellow fat spreads, and margarine as affected by temperature and physical abuse. – *Food Microbiology*. Vol. 20, No. 2, pp. 159–168.
- Idoui, T., Karam, E-N.** (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. - *GRASAS Y ACEITES*. Vol. 59, No. 4, pp. 361-367.
- Kłębukowska, L., Zadernowska, A., Wierzchowska**corresponding, **W. C.** (2015). Microbiological contamination of dried and lyophilized garlic as a potential source of food spoilage. – *Food Science and Technology*. Vol. 52, No. 3, pp. 1802–1807.
- Kociã-Tanackov, S. D., Dimiã, G. R., Tepiã, A. N., Vujicic, B. L.** (2009). Influence of *Allium Ampeloprasum* L. and *Allium Cepa* L. essential oils on the growth of some yeast and moulds. – *Faculty of Technology, University of Novi Sad*. No. 116, pp. 121-130.
- Kornacki, L. J., Flowers, S. L., Bradley, R. L.** (2011). Microbiology of Butter and Related Products. – *Applied Dairy Mikrobiology*. Second edition./ Marth E. H., Steele J. L. Copyright © Marcel Dekker, Inc. pp. 127-150.
- Krause, A. J.** (2006). Evaluation of consumer acceptance and storage stability of butter. – *Food science*, pp. 18-46 <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/770/1/etd.pdf>
- Krause, A. J., Miracle, R. E., Sanders, T. H., Dean, L. L., Drake, M. A.** (2008). The Effect of Refrigerated and Frozen Storage on Butter Flavor and Texture. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 91, No. 2, pp. 455-465.
- Ledenbach, H. L., Marshall, R. T.** (2009). Microbiological Spoilage of Dairy Products. – *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety*./ Editors: Sperber W. H., Doyle M. P. Hardcover. 369 pp.
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Majjala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.-J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H., Siitonen, A.** (2000). An Outbreak of *Listeria Monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in Finland – *The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 181, pp. 1838–1841.
- Mandel, A.** (2001). Võitehnoloogia. – Piimanduse käsiraamat. /Koost. Olkonen, A. Tartu: EMPÜ Loomakasvatusteaduste instituut lk 374-411
- NMKL 44(6):2004 -Kolilaadsed bakterid. Arvuline määramine toidus ja loomasöödas
- Parker, E. M.** (1948) Princely Packets of Golden Health (A History of Butter Packaging). Copyright 1948. <http://drinc.ucdavis.edu/research/butter.pdf> (vt 03.12.2016)
- Pârvu, M., Pârvu, A. E., Vlase, L., Roșca-Casian, O., Pârvu, O.** (2011). Antifungal properties of *Allium Lysinum* L. ethanol extract. – *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5, No. 10, pp. 2041-2046.

- Pham, T. H. V., Jeong, S., Chung, S., Kim, J.** (2016). *Brevundimonas albigilva* sp. nov., isolated from forest soil. - *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolog.* Vol. 66, pp. 1144 - 1150.
- Piimatöötlemise 2016 aasta ülevaade. – *Maaeluministeerium*.  
<https://www.agri.ee/sites/default/files/content/ylevaated/2016/ulevaade-piimatoostus-2016-04.pdf> (28.04.2017)
- Poikalainen, V.** (2004). Võitehnoloogia. EPMÜ Loomaarstiteaduskond, toiduteaduse osakond, Kirjastus Halo, Tartu, lk183
- Robinson R.K.** (2002). Microbiology cream and butter – Dairy Microbiology Handbook Third Edition. Copyright © John Wiley and Sons, Inc., New York (737p) pp. 123-174.
- Ruth van S. M., Koot A., Akkermans W., Araghipour N., Rozijn M., Baltussen M., Wisthaler M., Märk T. D., Frankhuizen R.** (2007). Butter and butter oil classification by PTR-MS. – *European Food Research and Technology*. Vol. 227, No. 1, pp. 307–317.
- Saaremaa või tooted. – *AS Saaremaa Piimatööstus*. [WWW] <http://www.saarejuust.ee/voi/> (07.04.2017)
- Sagdic O., Ozturk I., Bayram O., Kesmen Z., Yilmaz M. T.** (2010). Characterization of Butter Spoiling Yeasts and Their Inhibition by Some Spices. – *Journal of Food Science*. Vol. 75, No. 9, pp. 597-603.
- Salem, R. M., EI-Diasty, E.M.** (2009). Incidence of lipolytic and proteolytic fungi in some milk products and their public health significance. – *Arab Journal Biotech.*, Vol. 12, No. 1, pp. 49-56.
- Shi, J.** (2015). Standardisation of cultured butter processing for smallscale production. – Massey University, Albany, New Zealand. 135 pp.
- Shi, J., Le Maquer, M.** (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. – *Food Science: Nutrient*. Vol. 40, No. 1, pp. 1-42.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Virdi, J. S.** (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. – *The journal of Frontiers in Microbiology*. Vol 6, No. 791, pp. 1-16.
- Statista (2017). Butter production in selected countries 2015. <https://www.statista.com/statistics/195805/butter-production-in-selected-countries/> (24.03.2017)
- Suryavanshi, M. V., Ghosh, J. S.** (2010). Spoilage of White Unsalted Butter by Psychrophilic Lipolysis of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2036. – *British Journal of Dairy Science* Vol. 1, No. 1, pp. 26- 29.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Berg, D. E.** (2000). Fate of *Campylobacter jejuni* in Butter. – *Journal of Food Protection*. Vol. 63, No. 1, pp. 120–122.
- Zhou, J.** (1998). The role of microorganisms in deterioration of vegetable oil and measures of controlling – *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-product Protection* – Vol. 1, pp. 288-292.

- Teder, L.** (2016). Soolatud ja Soolamata Rõõsakoorevõi Kvaliteedi Hindamine Erinevate Säilitusrežiimide Korral. (Magistritöö) Eesti Maaülikool Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut. Toiduteaduse osakond. Tartu. 53 lk.
- Toiduseadus. Kestvuskatsete tegemise kord. (vastuvõetud 30.12.1999 nr 445). – *Riigi Teataja* <https://www.riigiteataja.ee/akt/71682> (02.05.2017)
- Toiduseadus. Toidu säilitamismõõdukus. (vastu võetud 05.08.2002 nr 66). – *Riigi Teataja* <https://www.riigiteataja.ee/akt/189067> (31.03.2017)
- Umar, M., Zubairu, A., Hamisu, H. S., Mohammed, I. B., Oko, J. O., Abdulkarim, I. M., Salisu, A., Yaya, A. A., Aliko, A. A.** (2016). Evaluation of Phytochemical and in vitro Antimicrobial Effects of *Solanum lycopersicum* Linn. (Tomato) on Oral Thrush and Human Cariogenic Pathogens – *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 11, No. 4, pp. 1-9.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J.** (2006). Dairy Science and Technology. (Second Edition). Taylor & Francis Group 763 lk.
- Vabariigi Valitsuse määrus nr 166. Toidugruppide suhtes esitatud mikrobioloogilised nõuded. ( vastu võetud 25.05.2000, kehtetu 01.05.2004, VV. määrus nr.166). – *Riigi Teataja* <https://www.riigiteataja.ee/akt/72021> (4.12.2016)
- Varga, L.** (2007). Microbiological quality of commercial dairy products. – *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Published ©FORMATEX <http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages487-494.pdf>
- Vau, R.** (2005). Rõõsakoorevõi mikrobioloogilise kvaliteedi uurimine tehnoloogilises protsessis. (Diplomitöö) Eesti Põllumajandusülikool Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut Toiduteaduse osakond. Tartu. 48 lk.

## Evaluation of Microbiological Quality of Butter

### SUMMARY

The Master thesis aimed to study the microbiological quality evaluation methods on four types of butter (traditional and butters with salt crystals, sundried tomato or ramsons (*Allium ursinum*)). Three types of standardised international sampling methods and one *in-house* method was applied, with differences in more explicit separation of serum and fat phases in butter samples. There is little or no information about different types of the butter and in differences resulting from the microbiological assessment methods. According to our knowledge this is the first attempt to explain the blending effect of plasma and fat phase of the butter influencing microbiological quality evaluation.

The amount of microbes in traditional and salt crystals containing butter is similar ( $p>0.05$ ), ranging from 2.05 – 2.65 log CFU/ml, while in butter with sundried tomato or ramsons the level is significantly higher compared to previous (2.89 – 3.55 log CFU/ml,  $p<0.05$ ). Molds and yeasts were present in only six butter batches amongst all (7% of samples), while most (67%) counts were below nationally established limits, <1,000 CFU/ml.

A strong negative correlation between the total count of microbes and fat content in samples was found. The higher was the fat content in sample, the lower was the count of microbes. In order to obtain more precise and detailed conclusions, further investigation involving higher samplesize is needed.

The count of microbes was higher in butter containing herbal additives compared to traditional and salt crystals containing butter. The results suggest that before adding herbal additives to the butter the microbiological quality of the additive should be determined and use of preventive measures should be considered to reduce the chance of microbial contamination.

In total of 109 bacterial colonies were isolated from butter serum and fat phase samples, from which 96 isolates based on their morfological characteristics were chosen for MALDI-TOF analyse. Only 47% of isolates, includeing 22 different bacterial species, were identified. It could be speculated that due to the expluatation specificity of MALDI-TOF analyser in the United Laboratories of Tartu University Hospital, optimised to detect clinically relevant

bacteria (pathogens), while the analysed butter samples contained normal microbiota (or a few opportunistic pathogens) found in rawmilk or dairy plant.

In conclusion, it is possible to say that the microbial quality of the butter produced in Estonia is very good. To assess a stronger connection between the evaluation methods of microbiological quality and different types of butter, the tested sample size must be significantly higher, covering different seasons due to fluctuations in raw milk, influencing microbiota in the butter.



**LISAD**

## Lisa 1. Töövahendid ja söötmed

Antud töös teostati kõik analüüsid kasutades aseptilisi töövõtteid. Analüüside teostamisel kasutati järgnevaid abivahendeid:

- tsentrifuug *Nova*;
- analüütiline kaal *Mettler Toledo 26562150-0*;
- kuumaveevann *Memmert WB 7*;
- proovide sulatamiseks kasutati steriilseid polüpropüleen tsentrifuugtuube *BluCapp<sup>TM</sup>*;
- lahjenduste tegemisel kasutati vorteksit (*vortex mixer*) *Heidolph-RELAX topp*;
- pipeteerimisel kasutati *Eppendorf Research 275204* 1 ml pipetti;
- külvidega Petri tassid inkubeeriti termostaatkapis *Memmert*;
- steriilset süstalt *BD Discardit<sup>TM</sup> II*;
- tõmbekapp;
- MALDI Biotyper, MBT Compass;
- Mikroskoop *Carl Zeiss - Axiostar plus*.

Töös kasutatud söötmed:

- mikroobide (bakterite) üldarvu määramisel agarsöödet – Milk Plate Count Agar (LAB 115) (LabM Ltd., Inglismaa);
- hallitus- ja pärmseente määramisel kasutati Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (LAB 36) (LabM Ltd., Inglismaa) agarsöödet;
- universaalsöötmena kasutati T.S.A (Difco Tm), Tryptic Soy Agar (LabM Ltd., Inglismaa) agarsöödet;
- kolilaadsete bakterite määramiseks kasutati V.R.B.A (LAB 31) Violet. Red. Bile. Agar (LabM Ltd., Inglismaa);
- laktobatsillide määramiseks kasutati M.R.S. (LAB093) Man, Rogosa and Sharpe Agar (LabM Ltd., Inglismaa);
- streptokokkide määramiseks kasutati M17 (LAB092) (LabM Ltd., Inglismaa).

## Lisa 2. Küsimustik „Või mikrobioloogiline hindamine“

### Või mikrobioloogiline hindamine

Tere, olen Eesti Maaülikooli toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia osakonna piimatehnoloogia 2. aasta magistrant. Seoses oma magistritööga „Või mikrobioloogilise kvaliteedi hindamine“, huvitab mind, kuidas hinnatakse hetkel või mikrobioloogilist kvaliteeti Eestis tegutsevate piimatööstuste laborites. Kõiki andmeid esitatakse anonüümselt. Oleksin väga tänulik, kui leiaksite aega vastata järgnevatele küsimustele:

1. Kas teie tööstus teostab ise või mikrobioloogilisi analüüse (milliseid?) või ostetakse teenus sisse (kellelt?)?

Your answer

---

2. Milliseid standardeid kasutate mikroobide määramisel toorpiimas (ISO nr. või muu)?

Your answer

---

3. Milliseid standardeid kasutate mikroobide määramisel pastöriseeritud piimas (ISO nr. või muu)?

Your answer

---

4. Milliseid standardeid kasutate mikroobide määramisel koores (ISO nr. või muu)?

Your answer

---

5. Milliseid standardeid kasutate mikroobide määramisel võis (ISO nr. või muu)?

Your answer

---

## Lisa 2 järg

6. Milliseid hindamismeetodeid te kasutate mikroobide määramisel toorpiimas?

- ☐ Mikroobide üldarv
- ☐ Hallitus- ja pärmseened
- ☐ Kolilaadsed bakterid
- ☐ Other: \_\_\_\_\_

7. Milliseid hindamismeetodeid te kasutate mikroobide määramisel pastöriseeritud piimas?

- ☐ Mikroobide üldarv
- ☐ Hallitus- ja pärmseened
- ☐ Kolilaadsed bakterid
- ☐ Other: \_\_\_\_\_

8. Milliseid hindamismeetodeid te kasutate mikroobide määramisel koores?

- ☐ Mikroobide üldarv
- ☐ Hallitus- ja pärmseened
- ☐ Kolilaadsed bakterid
- ☐ Other: \_\_\_\_\_

9. Milliseid hindamismeetodeid te kasutate mikroobide määramisel võis?

- ☐ Mikroobide üldarv
- ☐ Hallitus- ja pärmseened
- ☐ Kolilaadsed bakterid
- ☐ Other: \_\_\_\_\_

Lisa 2 järg

10. Kui tihti te teostate mikrobioloogilist kontrolli toorpiimas?

Your answer

---

11. Kui tihti te teostate mikrobioloogilist kontrolli pastöriseeritud piimas?

Your answer

---

12. Kui tihti te teostate mikrobioloogilist kontrolli koores?

Your answer

---

13. Kui tihti te teostate mikrobioloogilist kontrolli võis?

Your answer

---

14. Kui tihti te teostate mikrobioloogilist kontrolli ettevõtte väliselt teenust sisse ostes?

Your answer

---

15. Kui kõrge on teie ettevõttes lubatud mikroobide üldarvu piirmäär.

Your answer

---

Lisa 2 järg

**16. Milline on teie ettevõttes hindamissüsteem mikroobide hindamiseks?**

Your answer

---

**17. Kas te ekspordite võid Eestist välja?**

☐ Jah (siis vastake ka küsimusele 18)

☐ Ei

**18. Kas ja milliseid kriteeriume on Teie tööstusele esitatud mikroobide määramisel eksporditava maa poolt?**

Your answer

---

**19. Milliseid mikroobe Teie tööstuses määratakse ettevõtte siseselt ning milline on nende lubatud piirmäär (E. coli, enterobakterid, Salmonella sp., Listeria, laktobatsillid, laktokokid vms)?**

Your answer

---

**20. Milliseid mikroobe Teie tööstuses määratakse ettevõtte väliselt ning milline on nende lubatud piirmäär (E. coli, enterobakterid, Salmonella sp., Listeria, laktobatsillid, laktokokid vms)?**

Your answer

---

**21. Kas ja milliseid mikrobioloogilisi muutusi olete täheldanud või kvaliteedis erinevatel parameetritel (aeg, temperatuur, aastaaeg, mõni muu parameeter)?**

Your answer

---

**Lihthitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning  
juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, *Kai Kaidma*,

sünniaeg 21/10/1979 47910212726,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihthitsentsi) enda loodud lõputöö

***Või mikrobioloogiline kvaliteedi hindamine,***

mille juhendaja on *Helena Andreson*,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihthitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor \_\_\_\_\_

*allkiri*

Tartu, 31.05.2017

**Juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Luban lõputöö kaitsmisele.

Helena Andreson \_\_\_\_\_

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)